

Université de Montréal

**Étude de l'oligomérisation et de la fonction de canaux  
ioniques par spectroscopie de fluorescence et fluorométrie  
en voltage imposé**

par  
Hugo McGuire

Département de Physique  
Faculté des arts et des sciences

Thèse présentée à la Faculté des arts et des sciences  
en vue de l'obtention du grade de philosophiæ doctor (Ph.D.)  
en physique  
option biophysique et physiologie moléculaires

Avril, 2014

© Hugo McGuire, 2014



Université de Montréal  
Faculté des arts et des sciences

Cette thèse intitulée :

**Étude de l'oligomérisation et de la fonction de canaux ioniques par spectroscopie de fluorescence et fluorométrie en voltage imposé**

présentée par

Hugo McGuire

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Rémy Sauvé,	Président-rapporteur
Rikard Blunck,	Directeur de recherche
Nazzareno D'Avanzo,	Membre du jury
Simon Rainville,	Examineur externe
Pierre Chaurand	Représentant du doyen

Thèse acceptée le : .....





# Résumé

La fonction des canaux ioniques est finement régulée par des changements structuraux de sites clés contrôlant l'ouverture du pore. Ces modulations structurales découlent de l'interaction du canal avec l'environnement local, puisque certains domaines peuvent être suffisamment sensibles à des propriétés physico-chimiques spécifiques. Les mouvements engendrés dans la structure sont notamment perceptibles fonctionnellement lorsque le canal ouvre un passage à certains ions, générant ainsi un courant ionique mesurable selon le potentiel électrochimique. Une description détaillée de ces relations structure-fonction est cependant difficile à obtenir à partir de mesures sur des ensembles de canaux identiques, puisque les fluctuations et les distributions de différentes propriétés individuelles demeurent cachées dans une moyenne. Pour distinguer ces propriétés, des mesures à l'échelle de la molécule unique sont nécessaires.

Le but principal de la présente thèse est d'étudier la structure et les mécanismes moléculaires de canaux ioniques par mesures de spectroscopie de fluorescence à l'échelle de la molécule unique. Les études sont particulièrement dirigées vers le développement de nouvelles méthodes ou leur amélioration. Une classe de toxine formeuse de pores a servi de premier modèle d'étude. La fluorescence à l'échelle de la molécule unique a aussi été utilisée pour l'étude d'un récepteur glutamate, d'un récepteur à la glycine et d'un canal potassique procaryote.

Le premier volet porte sur l'étude de la stœchiométrie par mesures de photoblanchiment en temps résolu. Cette méthode permet de déterminer directement le nombre de monomères fluorescents dans un complexe isolé par le décompte des sauts discrets de fluorescence suivant les événements de photoblanchiment. Nous présentons ici la première description, à notre connaissance, de l'assemblage dynamique d'une protéine membranaire dans un environnement lipidique. La toxine monomérique purifiée Cry1Aa s'assemble à d'autres monomères selon la concentration et sature en conformation tétramérique.

Un programme automatique est ensuite développé pour déterminer la stœchiométrie de protéines membranaires fusionnées à GFP et exprimées à la surface de cellules mammifères. Bien que ce système d'expression soit approprié pour l'étude de protéines d'origine mammifère, le bruit de fluorescence y est particulièrement important et augmente significativement le risque d'erreur dans le décompte manuel des monomères fluorescents. La méthode présentée permet une analyse rapide et automatique basée sur des critères fixes. L'algorithme chargé d'effectuer le décompte des monomères fluorescents a été optimisé à partir de simulations et ajuste ses paramètres de détection automatiquement selon la trace de fluorescence. La composition de deux canaux ioniques a été vérifiée avec succès par ce programme.

Enfin, la fluorescence à l'échelle de la molécule unique est mesurée conjointement au courant ionique de canaux potassiques KcsA avec un système de fluorométrie en voltage imposé. Ces enregistrements combinés permettent de décrire la fonction de canaux ioniques simultanément à leur position et densité alors qu'ils diffusent dans une membrane lipidique dont la composition est choisie. Nous avons observé le regroupement de canaux KcsA pour différentes compositions lipidiques. Ce regroupement ne paraît pas être causé par des interactions protéine-protéine, mais plutôt par des microdomaines induits par la forme des canaux reconstitués dans la membrane. Il semble que des canaux regroupés puissent ensuite devenir couplés, se traduisant en ouvertures et fermetures simultanées où les niveaux de conductance sont un multiple de la conductance « normale » d'un canal isolé. De plus, contrairement à ce qui est actuellement suggéré, KcsA ne requiert pas de phospholipide chargé négativement pour sa fonction. Plusieurs mesures indiquent plutôt que des lipides de forme conique dans la phase cristalline liquide sont suffisants pour permettre l'ouverture de canaux KcsA isolés. Des canaux regroupés peuvent quant à eux surmonter la barrière d'énergie pour s'ouvrir de manière coopérative dans des lipides non chargés de forme cylindrique.

**Mots-clés :** Fluorescence de la molécule unique, fluorométrie en voltage imposé, canaux ioniques

# Abstract

The function of ion channels is finely regulated by structural changes of key domains controlling the pore opening. These structural modulations arise from interactions with the local environment, since several domains can be sensitive to specific physico-chemical properties. Movements generated in the structure become notably perceptible when channels open a passage for some ions, thus generating a measurable ionic current according to the electrochemical potential. A detailed description of these structure-function relationships is however difficult to obtain from measurements involving a set of identical channels, since the fluctuations and distributions of different individual properties remain hidden in an average. To differentiate these properties, single-molecule recordings are required.

The main purpose of this thesis is to study the structural aspects and molecular mechanisms of ion channels using fluorescence spectroscopy at the single-molecule level. Studies are oriented towards the development or improvement of new methods. A class of pore-forming toxin served as a first study model. Single-molecule fluorescence was also used to study an ionotropic glutamate receptor, a glycine receptor and a prokaryotic potassium channel.

The first part focuses on the study of stoichiometry using fluorescent subunit counting. This method allows a direct measure of the number of fluorescent monomers within a single complex by counting the number of step-wise fluorescence intensity decrease following photobleaching events. Here we present the first description, to our knowledge, of the dynamic assembly of a membrane protein in a lipid environment. The purified monomeric Cry1Aa toxin clusters with other monomers depending on the concentration and saturates in a tetrameric conformation.

An automated method has been developed to determine the stoichiometry of GFP-tagged membrane proteins expressed on mammalian cell surface. Although this expression

system is suitable for the study of proteins of mammalian origin, background fluorescence is particularly important and significantly increases the risk of error in the manual counting process. The presented method allows a fast and automated analysis based on fixed criteria. The algorithm responsible for counting fluorescent monomers was optimized from simulations and adjusts its detection parameters automatically according to the fluorescence trace recording. The composition of two ion channels was successfully verified using this program.

Finally, single-molecule fluorescence is measured together with ionic current of KcsA channels using a voltage-clamp fluorometry setup. These combined recordings allowed us to describe the function of ion channels simultaneously to their position and density as they diffuse in a lipid membrane of defined composition. We observed clustering of KcsA channels for various lipid compositions. Clustering does not appear to be caused by protein-protein interaction, but rather by microdomains induced by the shape of reconstructed channels in the lipid bilayer. It seems that clustered KcsA channels could then become coupled, resulting in cooperative gating events with conductance levels multiple to the “normal” unitary channel conductance. Moreover, as opposed to what is currently suggested, KcsA does not require a negatively charged phospholipid for its function. Several of our recordings rather suggest that conically shaped lipids in the lamellar liquid crystalline phase are sufficient to allow single channel opening. Clustered channels can on the other hand overcome the energy barrier to open cooperatively in uncharged cylindrical lipids.

**Keywords** : single-molecule fluorescence, voltage-clamp fluorometry, ion channels

# Table des matières

<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>I</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>III</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>V</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>IX</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>X</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>XII</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>XV</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
1.1 LES CANAUX IONIQUES .....	1
1.2 ORGANISATION DES SOUS-UNITÉS DES CANAUX IONIQUES .....	4
1.3 REGROUPEMENT DE CANAUX IONIQUES .....	14
1.4 RÉGULATION DES CANAUX IONIQUES PAR LES PROPRIÉTÉS DE MEMBRANE .....	16
1.5 FORMAT DE LA THÈSE .....	20
1.6 BIBLIOGRAPHIE .....	21
<b>BASES THÉORIQUES</b> .....	<b>35</b>
2.1 FONDEMENTS DE L'ANALYSE STATISTIQUE DES DISTRIBUTIONS .....	35
2.2 DÉVELOPPEMENT DE L'ALGORITHME DE PIF .....	40
2.2.1 <i>Filtrer le bruit de fond</i> .....	40
2.2.2 <i>Détection des événements de photoblanchiment</i> .....	45
2.3 BASES DE FLUORESCENCE.....	48
2.4 BIBLIOGRAPHIE .....	51
<b>SINGLE MOLECULE FLUORESCENCE STUDY OF THE BACILLUS THURINGIENSIS TOXIN CRY1AA REVEALS TETRAMERIZATION</b> .....	<b>55</b>
3.1 CAPSULE.....	57
3.2 SUMMARY .....	57

3.3	INTRODUCTION .....	57
3.4	EXPERIMENTAL PROCEDURES .....	60
3.4.1	<i>Purification, labeling and reconstitution of CryIAa into lipid vesicles</i> .....	60
3.4.2	<i>Fluorescence Measurements of Toxins in Supported Bilayer</i> .....	61
3.4.3	<i>Photobleaching Data Analysis</i> .....	61
3.5	RESULTS .....	62
3.5.1	<i>The toxin oligomerizes as a tetramer</i> .....	62
3.5.2	<i>Concentration dependent evolution of CryIAa oligomerization</i> .....	69
3.6	DISCUSSION .....	72
3.7	ACKNOWLEDGEMENTS .....	74
3.8	SUPPLEMENTAL INFORMATION .....	75
3.8.1	<i>Derivation of oligomer distribution</i> .....	75
3.8.2	<i>Calculation of the probability to observe <math>x</math> pentamers in an ensemble of <math>N</math> measurements</i> .....	76
3.8.3	<i>Summary of the results</i> .....	76
3.8.4	<i>Supplemental figures</i> .....	78
3.9	REFERENCES.....	79

**AUTOMATING SINGLE SUBUNIT COUNTING OF MEMBRANE PROTEINS IN MAMMALIAN**

<b>CELLS .....</b>	<b>85</b>	
4.1	CAPSULE.....	87
4.2	SUMMARY .....	87
4.3	INTRODUCTION .....	87
4.4	EXPERIMENTAL PROCEDURES .....	89
4.4.1	<i>Cell culture and transfection</i> .....	89
4.4.2	<i>Plasmid construction</i> .....	90
4.4.3	<i>Imaging</i> .....	90
4.4.4	<i>Generating simulated data</i> .....	91
4.4.5	<i>Definition of fluorescent spots</i> .....	91
4.4.6	<i>Trace filtering</i> .....	91
4.4.7	<i>Step detection</i> .....	92
4.4.8	<i>Quality control</i> .....	93
4.4.9	<i>Determination of accuracy</i> .....	94
4.4.10	<i>Simulations: calculation of the accuracy <math>p_{acc}</math></i> .....	94
4.4.11	<i>Kinetics of fluorescent protein blinking</i> .....	95
4.4.12	<i>Software</i> .....	96

4.5	RESULTS .....	96
4.5.1	<i>Identification of relevant spots</i> .....	96
4.5.2	<i>Step detection algorithm PIF</i> .....	100
4.5.3	<i>Testing step detection by PIF in simulations</i> .....	101
4.5.4	<i>Fluorescent subunit counting in mammalian cells</i> .....	102
4.6	DISCUSSION .....	105
4.5.1	<i>Comparison with previous studies</i> .....	105
4.5.2	<i>The challenges for future work on mammalian cells</i> .....	106
4.7	CONCLUSION .....	107
4.8	ACKNOWLEDGEMENTS .....	108
4.9	SUPPLEMENTAL INFORMATION .....	108
4.9.1	<i>Step detection details of PIF</i> .....	108
4.9.2	<i>Trace rejection</i> .....	111
4.9.3	<i>Calculating the probability of missed events</i> .....	113
4.9.4	<i>Supplemental figures</i> .....	115
4.10	REFERENCES .....	119

**STUDYING CLUSTERING OF KCSA CHANNELS USING SINGLE-CHANNEL VOLTAGE-CLAMP  
FLUORESCENCE IMAGING..... 125**

5.1	SUMMARY .....	127
5.2	INTRODUCTION .....	127
5.3	EXPERIMENTAL PROCEDURES .....	130
5.3.1	<i>KcsA purification, labeling and reconstitution in lipid vesicles</i> .....	130
5.3.2	<i>Supported bilayers</i> .....	131
5.3.3	<i>Voltage-clamp fluorescence imaging recordings of single KcsA channels</i> .....	132
5.3.4	<i>Tracking of single-channel diffusing in a lipid bilayer</i> .....	133
5.3.5	<i>Determining FRET efficiency and evaluating distances between single FRET pairs</i> .....	133
5.4	RESULTS .....	134
5.4.1	<i>Calibration of single channel fluorescence intensities</i> .....	134
5.4.2	<i>Channel diffusion and direct observation of single-channel clustering in planar lipid bilayers</i> ..	135
5.4.3	<i>Tracking Diffusion and Clustering of single KcsA channels</i> .....	137
5.4.4	<i>Single-pair FRET of KcsA clusters reveals a distance of about 60 Å separating the channels</i> ....	139
5.4.5	<i>Channel clustering occurs for various bilayer thickness values</i> .....	140
5.4.6	<i>Relation between bilayer thickness on channel clustering and channel activity</i> .....	142
5.4.7	<i>KcsA activity is determined by lipid phases</i> .....	143

5.5	DISCUSSION .....	147
5.6	ACKNOWLEDGEMENTS .....	150
5.7	SUPPLEMENTAL INFORMATION .....	150
5.7.1	<i>Supplemental figures</i> .....	150
5.8	REFERENCES.....	153
<b>CONCLUSION.....</b>		<b>161</b>
6.1	OLIGOMERIZATION DE LA TOXINE CRY1AA DE <i>B. THURINGIENSIS</i> : RETOUR SUR LES RÉSULTATS.....	162
6.2	OLIGOMERIZATION DE LA TOXINE CRY1AA DE <i>B. THURINGIENSIS</i> : LIMITATIONS DE L'ANALYSE DE SOUS-UNITÉS FLUORESCENTES.....	165
6.3	OLIGOMERIZATION DE LA TOXINE CRY1AA DE <i>B. THURINGIENSIS</i> : PERSPECTIVES .....	169
6.4	ANALYSE AUTOMATIQUE POUR LE DÉCOMPTE DE SOUS-UNITÉS .....	170
6.5	FLUOROMÉTRIE EN VOLTAGE IMPOSÉ DE CANAUX KCSA .....	173
6.6	BIBLIOGRAPHIE .....	179
<b>SOMMAIRE DES ÉQUATIONS .....</b>		<b>185</b>
	CHAPITRE 2 .....	186
	CHAPITRE 3 .....	187
	CHAPITRE 4 .....	187
	CHAPITRE 5 .....	188
	CHAPITRE 6 .....	189
<b>CURRICULUM VITAE SOMMAIRE.....</b>		<b>191</b>



## Liste des tableaux

S3.1	Summary of the Cry1Aa results. ....	77
5.1	Summary of physicochemical parameters and KcsA activity for different lipid compositions.....	144

# Liste des figures

1.1	Structures du canal potassique KcsA obtenues par cristallographie aux rayons X.....	3
1.2	Exemples de structures obtenues par cristallographie aux rayons X.....	4
1.3	Spectroscopie de fluorescence et FRET. ....	9
1.4	Exemple de trace avec des sauts de photoblanchiment. ....	12
1.5	Regroupements de canaux induits par la déformation de la membrane. ....	15
1.6	Illustration d'un phénomène de modulation fonctionnel par l'épaisseur hydrophobique de membrane. ....	19
1.7	Profile de pression latérale asymétrique induit par la présence de molécules de lysophosphatidylcholine (LPC) d'un seul côté de la membrane. ....	20
2.1	Comparaison entre la méthode du rolling ball et du kernel LoG. ....	43
2.2	Effet du filtre de Chung-Kennedy. ....	44
2.3	Représentation du principe de Franck-Condon. ....	49
3.1	Single toxin detection using fluorescence. ....	64
3.2	Experimental distributions of photobleaching steps.....	66
3.3	Binomial and Poisson Distributions. ....	67
3.4	Theoretical model. ....	70
S3.1	Experimental distributions in POPE-POPC.....	78
S3.2	Poisson Probability Density Function. ....	79
4.1	PIF automated analysis. ....	97
4.2	Analysis of PIF filtering and accuracy. ....	98
4.3	PIF automated analysis over GluK2 and GlyR $\alpha$ 1. ....	103
S4.1	Details of PIF analysis. ....	115
S4.2	PIF step detection algorithm described as conditions for segment averaging.....	117
S4.3	Effect of step detection parameters on PIF automated analysis over GluK2. ....	118

S4.4	Effect of blinking on step detection accuracy.....	119
5.1	Illustration of the single-channel voltage-clamp fluorescence imaging setup.....	129
5.2	Fluorescence on supported bilayers versus planar lipid bilayer. ....	136
5.3	Temporal evolution of KcsA clustering. ....	137
5.4	Direct observation of KcsA clustering. ....	138
5.5	KcsA clustering is observed for various thickness conditions. ....	141
5.6	Coupled KcsA gating involving several channels. ....	143
5.7	Lipid dependence of single channel activity. ....	145
S5.1	Open probability of KcsA-H124C (E71A) as a function of pH for two different lipid compositions. ....	150
S5.2	Supplemental images of KcsA clustering in 20:1-22:1 PC/decane. ....	151
S5.3	Illustration of the influence of multi-labeling when evaluating distances by FRET measurements.....	152
S5.4	Example of a simultaneous fluorescence and current recording showing coupled gating activity.....	153
6.1	Illustration de l'oligomérisation de la toxine Cry1Aa en fonction de la concentration.....	165
6.2	Problème du marquage non-spécifique. ....	166
6.3	Problème de la colocalisation de complexes. ....	167
6.4	Problème des petites valeurs de probabilité de fluorescence par monomère. ....	168
6.5	Distributions binomiales du nombre de sauts de fluorescence pour des oligomères du troisième au septième ordre où la probabilité de fluorescence est de 40%, 60% ou 80%. ....	169
6.6	Fluorométrie en voltage imposé du canal potassique KcsA. ....	177
6.7	Fluorométrie en voltage imposé avec le canal potassique de <i>Shaker</i> . ....	178

# Liste des abréviations

## -A-

ADN : acide désoxyribonucléique

AFM : *atomic force microscopy*

ATP : adénosine triphosphate

## -B-

BK : canal potassique à haute conductance activé par le calcium

## -C-

C-K : Chung-Kennedy

CRAC : *Calcium Release-Activated Channels*

CNG : *Cyclic nucleotide-gated*

## -D-

DDM : n-Dodecyl  $\beta$ -D-Maltopyranoside

DOPC : 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

DPhPC : 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3- phosphatidylcholine

## -E-

eGFP : *enhanced green fluorescent protein*

EOL : *efficiency of labeling*

ER : *endoplasmic reticulum*

## -F-

FRET : *Förster resonance energy transfer*

## -G-

GFP : *green fluorescent protein*

GPCR : *G protein-coupled receptors*

## -H-

HCN : *Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated*

## -K-

Kv : canaux dépendant du voltage sélectifs au potassium

## -L-

LoG : *Laplacian of Gaussian*

LPC : lysophosphatidylcholine

**-M-**

msfGFP : *monomeric superfolder green fluorescent protein*

**-N-**

NMDA : *N-methyl-D-aspartate*

**-P-**

PAGE : *polyacrylamide gel electrophoresis*

PIF : *progressive idealization filtering*

PIP2 : phosphatidylinositol-4,5-diphosphate

PC : phosphatidylcholine

PG : phosphatidylglycerol

POPC : 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

POPE : 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine

**-S-**

SDS : *sodium dodecyl sulfate*

SNR : *signal-to-noise ratio*

SUV : *small unilamellar vesicle*

**-T-**

TIRF : *total internal reflection fluorescence*

TMRM (*Tetramethylrhodamine-5-Maleimide*)

TRP : *transient receptor potential*

*À mes sources d'inspiration  
À toutes ces personnes qui m'ont permis de  
développer mes talents, d'ouvrir mes horizons et  
qui ont partagé généreusement leurs passions.  
Vous avez fortement contribué à forger la  
personne que je suis devenue.*

# Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord Rikard Blunck, mon directeur de recherche, pour m'avoir donné une grande liberté quant aux projets de recherche. Son apport scientifique et son aide à bien orienter et structurer les publications ont été d'une précieuse importance pour tous les projets réalisés et ceux en cours. Je le remercie également pour m'avoir proposé les sujets de recherche impliquant des expériences à l'échelle de la molécule unique. Bien que ces projets peuvent souvent être difficiles à mener à bien, je crois qu'ils représentent l'avenir de la biophysique, notamment lorsque plusieurs techniques sont utilisées simultanément. J'ai eu l'occasion de faire progresser ce domaine tant au niveau expérimental que théorique, ce qui était exactement ce que je recherchais. Merci donc pour la confiance accordée envers mes capacités à faire avancer ces travaux.

Je remercie Derek Bowie et Mark Arousseau de l'université McGill pour avoir initié notre grande collaboration sur la stœchiométrie des récepteurs glutamates ionotropes. Nous avons accompli un travail formidable ensemble qui a même été reconnu et recommandé par la *Faculty of 1000* comme étant d'importance particulière dans notre domaine. Notre collaboration est une belle démonstration de la force des équipes multidisciplinaires.

J'aimerais remercier également les membres du jury qui ont acceptés d'évaluer cette thèse. Je remercie finalement mes collègues de laboratoire, passés et présents, pour les discussions enrichissantes et les bons moments passés ensemble. La multidisciplinarité du groupe m'a permis d'en apprendre beaucoup sur différents sujets qui me sont moins familiers.





# *Chapitre 1*

## **Introduction**

### **1.1 Les canaux ioniques**

La communication entre les cellules du corps humain est contrôlée par diverses protéines localisées dans la membrane cellulaire. Celles-ci dictent le flux d'information traversant la membrane cellulaire, qui est à elle seule une barrière pour les ions, hormones, sucres, neurotransmetteurs, macromolécules et plusieurs molécules de nature polaire (1). Parmi ces protéines membranaires, les canaux ioniques sont présents dans la membrane de toutes les cellules. Ces protéines contrôlent la perméabilité membranaire des ions, qui diffusent suivant leur gradient électrochimique. Ce courant ionique est notamment à l'origine du potentiel de repos des cellules, source énergétique essentielle à leur fonctionnement. Les canaux localisés dans les cellules excitables occupent un rôle particulièrement important, alors qu'ils sont responsables des potentiels d'action nécessaires au système nerveux et cardiaque ainsi qu'à la contraction musculaire (2).

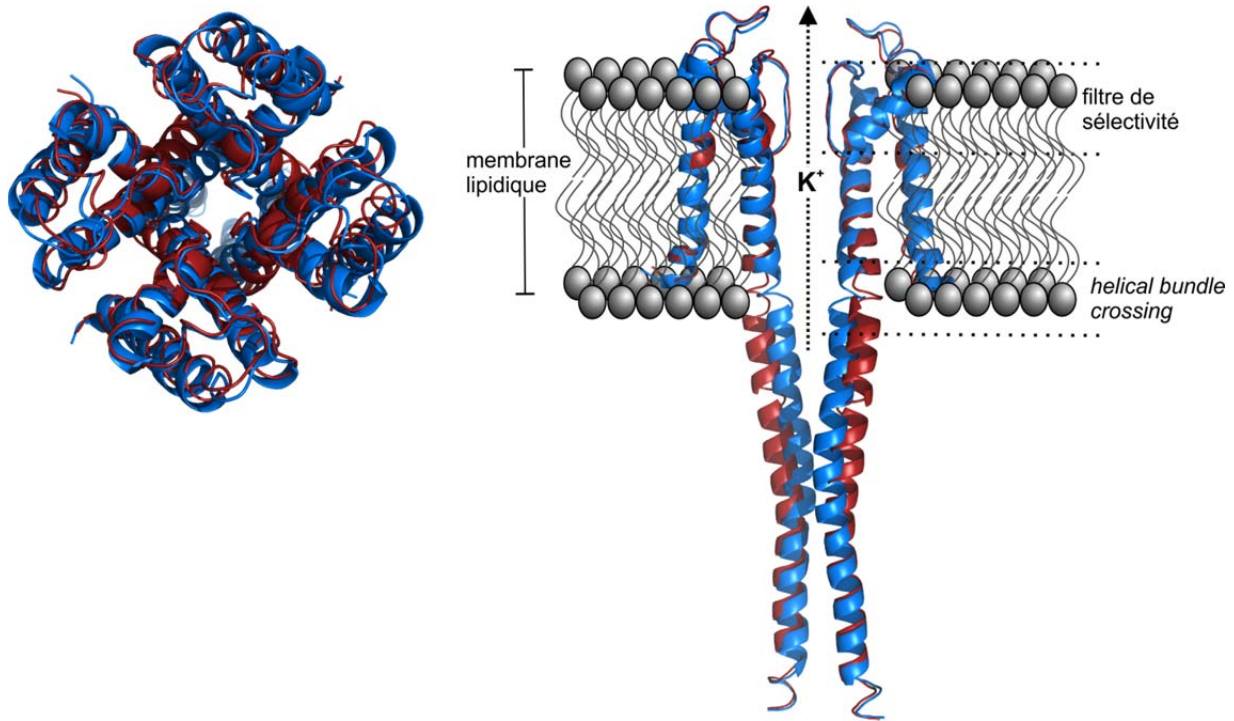
Différents types de canaux existent, regroupés selon leur sélectivité ionique et leurs mécanismes d'ouverture. La sélectivité se caractérise par la capacité d'un canal à favoriser le passage de certains ions spécifiques à travers son pore. Les canaux ioniques sont généralement très sélectifs aux ions satisfaisant une taille et une charge donnée. Par exemple, les canaux potassiques sont environ  $10^3$ - $10^4$  fois plus sélectifs à l'ion potassium qu'à l'ion sodium (2,3).

Les ions qui satisfont les critères de sélectivité d'un canal peuvent le traverser, à condition que sa conformation le permette. Un canal s'ouvre, se ferme ou adopte des conformations intermédiaires responsables de divers comportements fonctionnels. Ces relations structure-fonction résultent des interactions moléculaires entre les acides aminés

composant les canaux et l'environnement local (4). Ces interactions forment ainsi la structure des canaux et sont responsables des transitions qui se produisent entre les différents états accessibles. Les canaux ioniques peuvent être particulièrement sensibles à un changement d'une propriété physico-chimique donnée. Selon le type de canal ionique, un changement au niveau du potentiel électrique membranaire, de la température ou du pH, ainsi que la liaison d'un ligand ou un stress mécanique peut notamment mener à son ouverture.

L'étude des mécanismes moléculaires desquels découlent les relations structures-fonctions requiert une compréhension détaillée de la structure et des mouvements structuraux possibles. La première structure à haute résolution d'un canal ionique fut celle du canal potassique bactérien KcsA de *Streptomyces lividans* (5), obtenue par cristallographie aux rayons X en 1998 (6). Cette structure révèle une architecture précise du pore dans son état fermé, ce qui permet de cibler des régions potentiellement impliquées dans divers mécanismes fonctionnels. C'est notamment à partir de cette structure que la compréhension des bases moléculaires de la sélectivité ionique et de la conduction a pu progresser (7-10).

L'arrangement tridimensionnel du canal KcsA révèle deux régions du pore particulièrement importantes à la conduction de l'ion potassium. Le filtre de sélectivité, en bordure de la région extracellulaire (Fig. 1.1), se caractérise par son diamètre très étroit, où un ion hydraté ne peut circuler. Des groupes carbonyles localisés dans le filtre de sélectivité permettent à un ion potassium déshydraté d'être stabilisé dans cette section du pore lors de son passage (9). Les interactions qu'ont ces groupes avec les ions localisés dans le filtre défavorisent le passage des anions, cations divalents et ions  $\text{Na}^+$ , alors que les ions  $\text{K}^+$  traversent à peu près sans barrière d'énergie (10). En bordure de la région intracellulaire se situe une région où des hélices alpha formant le canal peuvent se rapprocher et ainsi bloquer le flux ionique (6). Cette région, appelée le *helical bundle crossing*, est donc déterminante pour les mécanismes d'ouverture énoncés plus haut (Fig. 1.1).



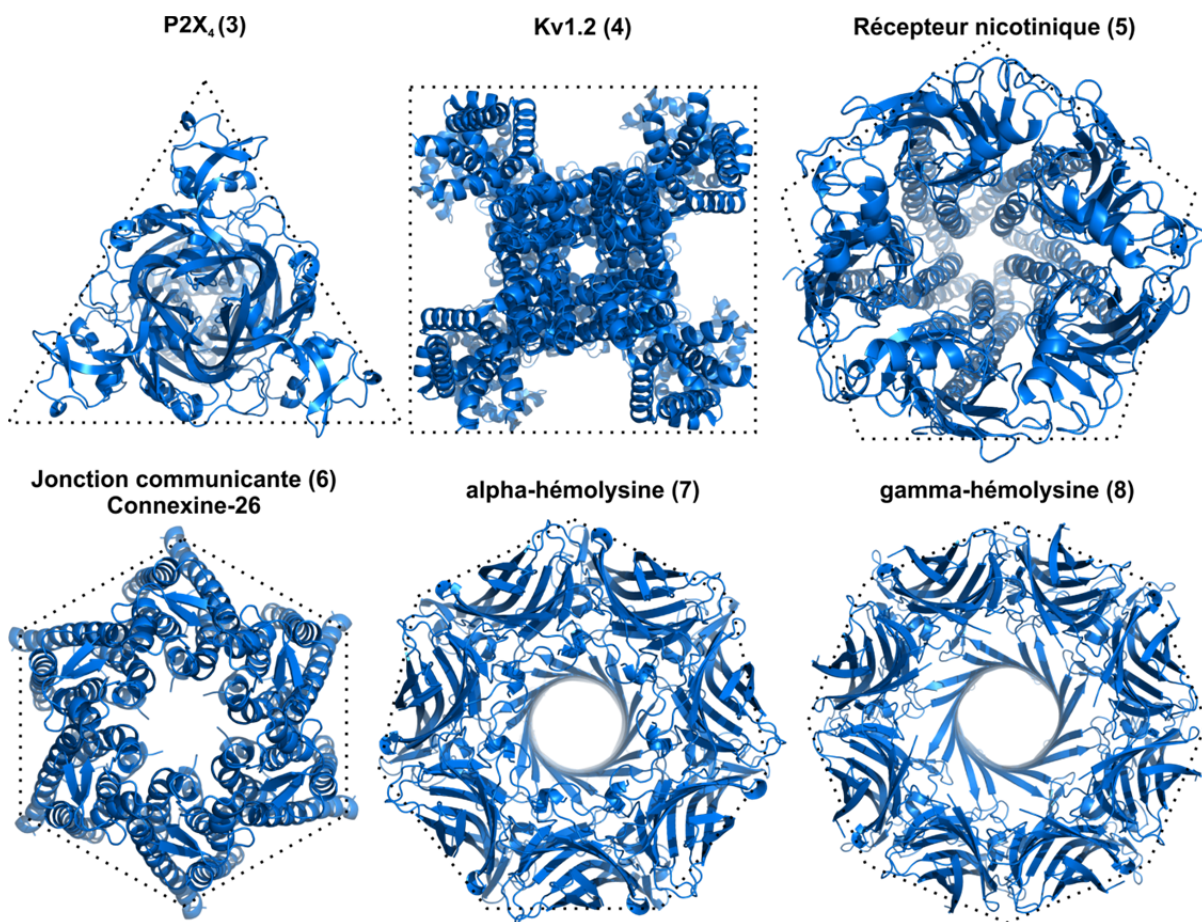
**Figure 1.1** | Structures du canal potassique KcsA obtenues par cristallographie aux rayons X. Les états fermé (fichier pdb 3EFF (11)) et ouvert (fichier pdb 3PJS (12)) sont représentés en bleu et en rouge, respectivement. Une perspective du dessus est montrée à gauche, alors qu'une vue de côté est illustrée à droite, avec deux sous-unités sur quatre pour plus de clarté.

Bien que la cristallographie aux rayons X puisse mener à des structures hautement résolues (2-4 Å), elles sont particulièrement difficiles à obtenir dans le cas des protéines membranaires, comme les canaux ioniques. Leurs surfaces hydrophobes, leur flexibilité et leur instabilité rend leur étude par cristallographie généralement difficile (13). D'autre part, le résultat obtenu n'identifie qu'un seul état du canal, dans un environnement qui ne reflète pas celui physiologique. D'autres méthodes sont alors utilisées pour compléter ou obtenir des informations structurales, notamment la microscopie électronique, la microscopie à force atomique, la résonance magnétique nucléaire, la résonance paramagnétique électronique et la spectroscopie de fluorescence.

La présente thèse met l'accent sur la détermination d'informations structurales par spectroscopie de fluorescence. Une attention particulière est accordée à l'organisation en sous-unités des canaux ioniques, qui est décrite dans la prochaine section.

## 1.2 Organisation des sous-unités des canaux ioniques

Le pore où la conduction ionique s'effectue est généralement localisé au long de l'axe central formé par une organisation symétrique de plusieurs sous-unités. La capacité du pore à stabiliser un ion de taille et de charge spécifique, en plus de pouvoir se fermer et s'ouvrir, émerge donc de cette symétrie. Selon ce qui est actuellement connu, le nombre de sous-unités qui participent à cette structure varie généralement entre 3 et 8, mais n'est pas restreint à cet intervalle (Fig. 1.2).



**Figure 1.2** | Exemples de structures obtenues par cristallographie aux rayons X. Pour illustrer la symétrie des canaux ioniques, ceux-ci sont entourés par des polygones du même ordre que les structures. Celles-ci proviennent des fichiers pdb 39HV (P2X<sub>4</sub> (14)), 2A79 (Kv1.2 (15)), 2BG9 (récepteur nicotinique (16)), 2ZW3 (Connexine-26 (17)), 7AHL (alpha-hémolysine (18)) et 3B07 (gamma-hémolysine (19)).

Parmi les exemples les mieux décrits, les récepteurs P2X, canaux ioniques sélectifs aux cations et activés par des molécules d'ATP, sont formés de 3 sous-unités (14,20). Les canaux dépendants du voltage sélectifs au potassium ( $K_V$ ) sont quant à eux organisés en tétramères (15,21,22). Cet assemblage semble être partagé par de nombreux types de canaux ioniques, notamment les canaux potassiques à rectification entrante ( $K_{IR}$ ), les canaux HCN (*Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated*), CNG (*Cyclic nucleotide-gated*), TRP (*transient receptor potential*) et les récepteurs glutamates ionotropes (23-29). Les canaux dépendants du voltage sélectifs au sodium ( $Na_V$ ) ou au calcium ( $Ca_V$ ) ont aussi un motif répété de 4 sous-unités, mais qui sont reliés physiquement, formant ainsi une seule chaîne d'acides aminés (30-32). L'architecture à 5 sous-unités a été observée pour les récepteurs *cys-loop* (e.g. récepteurs à la glycine, récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine, récepteurs de l'acide gamma-aminobutyrique de type A ( $GABA_A$ )) (33-35), tandis que 6 sous-unités composent les jonctions communicantes (17,36). Il existe aussi des exemples de formation de canaux ioniques à 7 ou 8 sous-unités par des toxines formeuses de pores, tel l'alpha-hémolysine (18,37,38), la gamma-hémolysine (19), la leucocidine (39) et l'antigène protecteur de l'anthrax (40-43).

L'organisation en sous-unité des canaux ioniques est un aspect structural fondamental qui contrôle leur fonction. Elle influence notamment la cinétique des canaux ioniques. Par exemple, l'ouverture des canaux  $K_V$  semble précédée par l'activation du domaine sensible au voltage de chacune des quatre sous-unités (44,45). Les états structuraux de chacune des sous-unités et les transitions entre ces états régulent donc la fonction globale observée. Cette influence des sous-unités sur la cinétique des canaux est d'ailleurs particulièrement importante pour la génération des potentiels d'action des cellules excitables (46), qui est permise par l'ouverture nettement plus rapide des canaux  $Na_V$  relativement aux canaux  $K_V$ . Il a été proposé que cette différence soit le résultat d'un niveau significatif de coopérativité entre les régions sensibles au voltage des quatre sous-unités des canaux  $Na_V$ , contrairement aux canaux  $K_V$  (47). De plus, il est possible que l'activation de trois domaines sensibles au voltage et l'activation partielle du quatrième soient suffisantes pour ouvrir les canaux  $Na_V$  (48), accélérant d'autant plus la réponse à une dépolarisation relativement aux canaux  $K_V$ .

Une autre influence possible de l'organisation des sous-unités des canaux ioniques sur leur fonction est la présence de niveaux de conductance partielle. Des mesures électrophysiologiques à l'échelle du canal unique ont montré que la conductance de canaux ioniques se situe parfois à des niveaux intermédiaires, inférieurs à l'état de conduction normalement observé (28,49-52). Ces niveaux de conductance apparaissent d'ailleurs plus fréquemment si l'activation des canaux est partielle (e.g. faible dépolarisation pour les canaux dépendants du voltage). Les enregistrements électrophysiologiques suggèrent fortement que ces événements puissent émerger d'ouvertures partielles, où des sous-unités se retrouvent en conformation ouverte de manière indépendante (50,53).

En plus de ces influences fonctionnelles, des sous-unités auxiliaires peuvent aussi parfois s'ajouter à l'organisation initiale d'un canal et ainsi modifier ses propriétés. C'est par exemple le cas des sous-unités Neto1 et Neto2 qui se lient au récepteur glutamate formé par les sous-unités GluK2. Ces deux types de sous-unités provoquent notamment une réduction significative de la rectification entrante des canaux GluK2. La cinétique de désensibilisation est aussi altérée, alors que celle-ci apparaît incomplète avec Neto1 et s'amorce plus tardivement avec Neto2 (54).

Les canaux ioniques ne sont pas nécessairement composés de sous-unités identiques (homomère). Plusieurs études décrivent le regroupement de sous-unités différentes pour un même type de canal (hétéromère). Par exemple, les sous-unités P2X<sub>2</sub> forment un trimère à eux seuls, contrairement aux sous-unités P2X<sub>6</sub>. Ces dernières peuvent toutefois se mélanger à une ou deux sous-unités P2X<sub>2</sub> et former un hétéro-trimère (55). Le récepteur à la glycine forme un homo-pentamère avec des sous-unités alpha-1 ou un hétéro-pentamère avec trois sous-unités alpha-1 et deux sous-unités bêta (56). Les sous-unités GluK1, GluK2 et GluK3 des récepteurs kaïnate peuvent former des homo-tétramères et hétéro-tétramères, alors que les sous-unités GluK4 et GluK5 doivent s'associer avec un des trois premiers types (57-59). Ces regroupements hétérogènes permettent une régulation de la fonction des canaux, tel que montré pour le mélange P2X<sub>2/6</sub> qui est plus perméable à l'ion calcium que le canal formé uniquement de sous-unités P2X<sub>2</sub> (60).

Différentes méthodes permettent d'étudier la composition en sous-unités de canaux ioniques. Puisque les structures à haute résolution par cristallographie aux rayons X sont

difficiles à obtenir pour les protéines membranaires, d'autres méthodes biophysiques sont généralement priorisées. Par exemple, le *blue native PAGE* (*polyacrylamide gel electrophoresis*) est souvent utilisé pour estimer le poids moléculaire de canaux ioniques, et donc le nombre de sous-unités qui les composent (33,61,62). L'idée repose sur l'utilisation de l'électrophorèse en condition non dénaturante, afin de préserver les complexes à plusieurs sous-unités. Un marqueur bleu chargé négativement (*Coomassie Brilliant Blue*) se lie à la surface de la protéine membranaire, principalement sur les acides aminés hydrophobes et basiques, pour lui conférer une charge globale négative. Les protéines sont donc entraînées dans un champ électrique et séparées selon leur grosseur dans un gel à gradient de polyacrylamide. Une seconde séparation, cette fois en présence de SDS (*sodium dodecyl sulfate*) pour dénaturer les complexes, est normalement effectuée pour caractériser les sous-unités des complexes isolés. Le *blue native PAGE* a notamment permis de déterminer correctement la structure trimérique des récepteurs P2X (20) et d'étudier l'assemblage hétéromérique de sous-unités du récepteur nicotinique selon différentes combinaisons (33). Plusieurs complexes à la membrane d'*Escherichia coli* ont aussi été détectés suivant cette méthode (63,64). Cependant, il peut parfois devenir difficile de mettre en évidence précisément l'organisation en sous-unités avec cette technique. La détermination du poids moléculaire associé à une organisation particulière implique une comparaison de la migration avec d'autres protéines dont le poids moléculaire est connu (61,62). Or, la migration dans le gel dépend notamment de la forme de la protéine. Aussi, le poids moléculaire de la protéine est affecté par les molécules de détergent et de marqueur bleu liées à la protéine (65,66).

L'assemblage de sous-unités peut aussi être évalué par ultracentrifugation analytique. Cette méthode s'appuie sur l'observation de la redistribution d'une protéine, purifiée et solubilisée, provoquée par l'application d'une force générée par centrifugation. Étant donné que cette redistribution dépend notamment du poids moléculaire de la protéine, l'organisation en sous-unité peut être extrapolée. Par exemple, une étude récente sur les récepteurs kaïnate a permis de détecter le regroupement en dimère d'hétéro-dimères des domaines amino-terminaux des sous-unités GluK2 et GluK5 (67). Pour l'étude de domaines transmembranaires solubilisés, les résultats peuvent s'avérer difficile à obtenir précisément, puisque les molécules

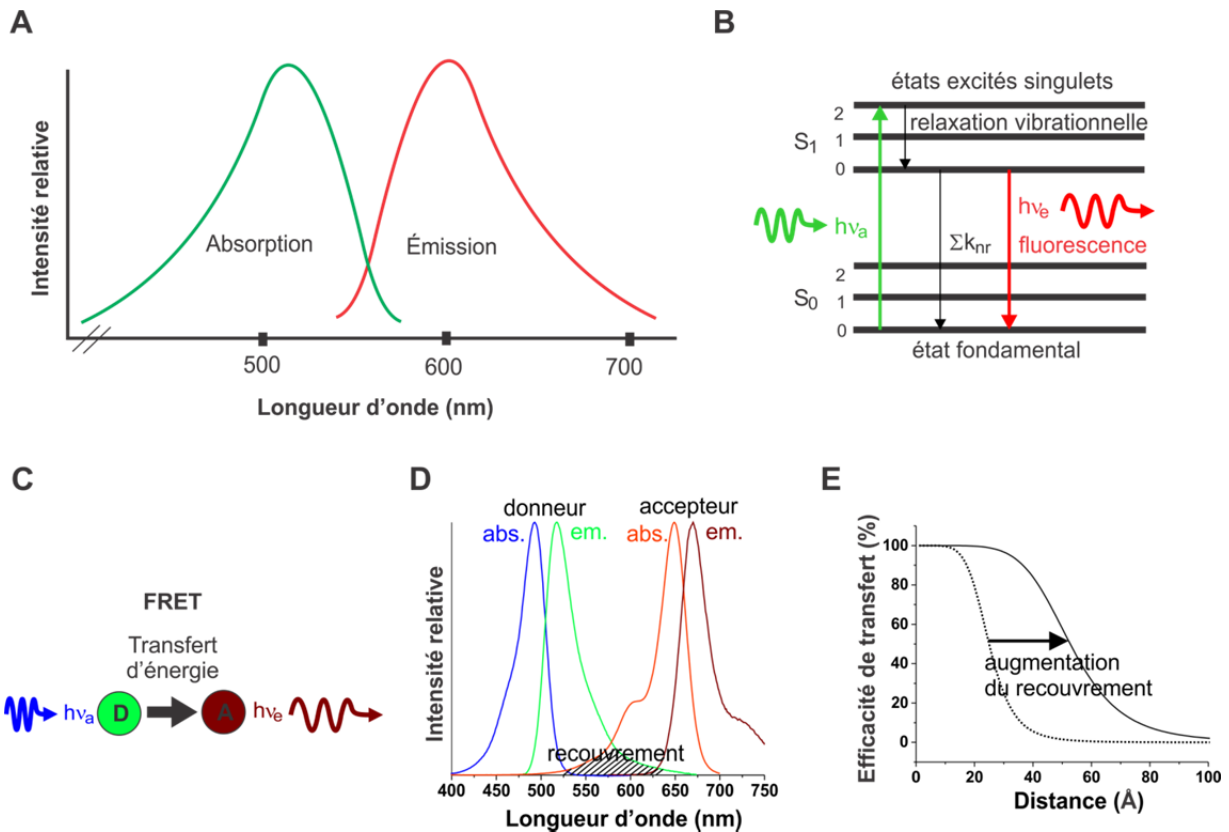
de détergent liées aux protéines contribuent au poids moléculaire apparent. Il est donc nécessaire de considérer la présence de détergent dans l'analyse des résultats (68).

Il est aussi possible de déduire l'organisation des sous-unités d'un canal par études fonctionnelles sur des sous-unités physiquement reliées entre elles. Pour exprimer ce type de complexe avec un nombre choisi de sous-unités, la séquence génétique des sous-unités désirées est introduite en chaîne dans une seule molécule d'ADN. Des complexes avec différentes organisations peuvent ensuite être exprimés et étudiés fonctionnellement par électrophysiologie pour vérifier s'ils produisent des canaux ioniques fonctionnels et ainsi déduire l'organisation des sous-unités qui les composent. Par exemple, cette méthode a été exploitée pour déduire la conformation tétramérique des canaux potassiques sensibles au voltage transmembranaire (21) et de canaux CRAC (*Calcium Release-Activated Channels*) (69).

Dans les cas où le nombre de sous-unités est connu, le principe de transfert d'énergie entre deux molécules fluorescentes (FRET : *Förster Resonance Energy Transfer*) permet de décrire la stœchiométrie et l'organisation d'hétéromères (70,71). En spectroscopie de fluorescence, un photon dont la longueur d'onde est compatible avec le spectre d'absorption de la molécule fluorescente amène celle-ci dans un niveau électronique excité (Fig. 1.3 A,B). Il y a ensuite relaxation vers le niveau vibrationnel de base du premier état excité, qui provoque un déplacement du spectre d'émission relativement à l'absorption. L'émission correspond à la transition électronique du premier niveau excité aux états vibrationnels du niveau énergétique de base (72). Selon ce principe, les photons émis par le fluorophore peuvent être discriminés de ceux de l'excitation grâce à des filtres optiques. Dans le cas du FRET, une seconde molécule fluorescente est à proximité, normalement entre 10 et 100 Å. Il peut y avoir transfert d'énergie non-radiatif de la première molécule fluorescente à la seconde par interaction dipôle-dipôle, à condition que le spectre d'émission de la première recouvre le spectre d'absorption de la seconde (Fig. 1.3 C,D). Plus la distance qui les sépare diminue, plus le taux de transfère d'énergie augmente (72). Cette relation dépend aussi particulièrement du degré de recouvrement des spectres et des propriétés physiques des molécules fluorescentes. De façon générale, plus ce recouvrement spectral est significatif, plus le transfert d'énergie demeure efficace à des distances importantes (Fig. 1.3 E). Le FRET permet donc d'évaluer la



proximité entre deux molécules fluorescentes différentes, un donneur et un accepteur, puisque l'intensité des deux fluorophores peut être distinguée spectroscopiquement (Fig. 1.3 D). Par exemple, si le taux de transfert du donneur à l'accepteur augmente (les fluorophores se rapprochent), l'émission du donneur diminue alors que celle de l'accepteur augmente.



**Figure 1.3** | Spectroscopie de fluorescence et FRET. (A) Exemple d'un spectre d'absorption (en vert) et d'émission (en rouge) d'un fluorophore. (B) Diagramme de Jablonski simplifié pour la fluorescence. L'absorption d'un photon (en vert) est indiquée, suivie de la relaxation vibrationnelle au premier état excité et d'une émission radiative (en rouge) ou non radiative (en noir). Les niveaux énergétiques S0 (fondamental), S1 (1<sup>er</sup> état excité) et S2 (2<sup>e</sup> état excité) ainsi que les sous-niveaux d'énergie vibrationnelle (0,1,2) sont aussi illustrés. (C) Illustration du concept du FRET. (D) Le spectre d'émission du donneur doit recouvrir le spectre d'absorption de l'accepteur. (E) Pour différentes paires donneur-accepteur où l'efficacité quantique du donneur et le coefficient d'absorption de l'accepteur sont similaires d'une paire à l'autre, une augmentation du recouvrement spectral déplace la courbe d'efficacité de transfert vers de plus grandes distances.

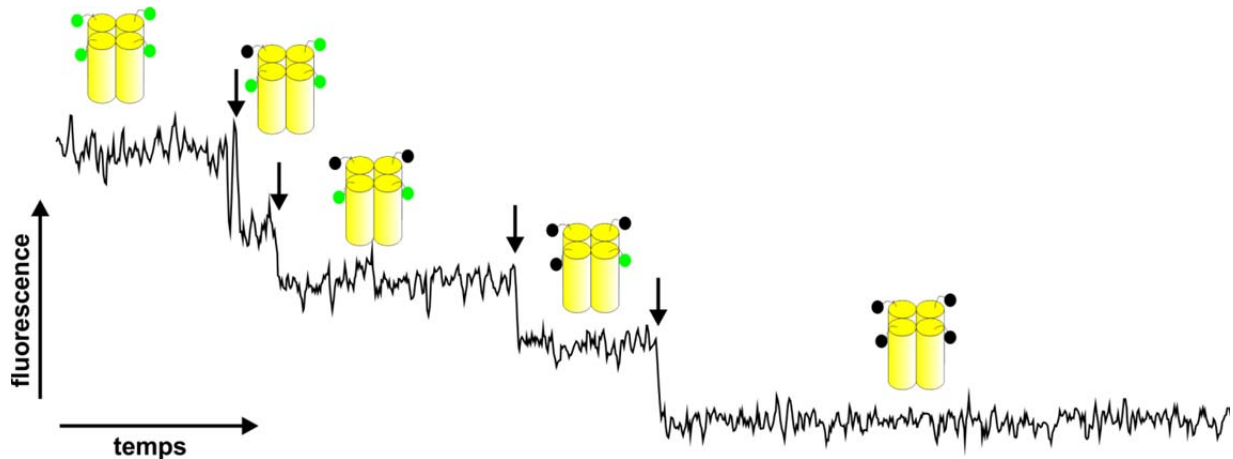
En utilisant ce principe de FRET, des mesures d'intensité peuvent permettre de détecter des conformations spécifiques. Par exemple, suivant cette idée, la stœchiométrie du

canal CNG des photorécepteurs en bâtonnets a été déduite à trois sous-unités CNGA1 pour une sous-unité CNGB1 (71). Dans cette étude, l'évaluation de la stœchiométrie est effectuée suivant principalement trois expériences de transfert d'énergie avec deux protéines fluorescentes : eCFP (donneur) et eYFP (accepteur). Dans la première expérience, la sous-unité CNGA1 est fusionnée à eCFP, alors que la sous-unité CNGB1 est fusionnée à eYFP. Cette expérience sert à s'assurer que les sous-unités des deux espèces s'assemblent et que le signal de FRET est important. Dans la seconde expérience, deux constructions de la sous-unité CNGA1 sont produites en y fusionnant l'une ou l'autre des protéines fluorescentes. Ces constructions sont co-exprimées avec la sous-unité CNGB1 et l'assemblage hétéromérique est vérifié fonctionnellement. Dans la troisième expérience, le même processus est répété, mais cette fois en inversant les rôles des sous-unités CNGA1 et CNGB1. Un signal de FRET observé pour la seconde expérience, mais pas pour la troisième signifie qu'il y a trois sous-unités CNGA1 pour une sous-unité CNGB1. À l'inverse, un signal de FRET observé pour la troisième expérience, mais pas pour la seconde signifie qu'il y a trois sous-unités CNGB1 pour une sous-unité CNGA1. Si le transfert d'énergie se produit pour la seconde et la troisième expérience, la stœchiométrie est de deux-sous-unités CNGA1 pour deux sous-unités CNGB1.

Un important problème émerge des méthodes décrites ci-dessus, puisqu'elles étudient l'organisation en sous-unité sur un ensemble de canaux. Elles ne mesurent donc qu'une moyenne, alors que plusieurs populations pourraient coexister pour un même canal. Des mesures à l'échelle de la molécule unique sont nécessaires pour obtenir l'information de différentes populations. Par exemple, si le nombre de sous-unités varie ou si plusieurs stœchiométries sont possibles, des mesures sur des ensembles de canaux ne peuvent pas identifier ces populations, alors que les mesures à l'échelle de la molécule unique offrent la possibilité de distinguer et d'observer les populations, une seule à la fois. Pour obtenir ce type de résolution, la microscopie à force atomique (AFM : *Atomic Force Microscopy*) et la spectroscopie de fluorescence sur des molécules distinguables sont deux outils puissants. L'AFM peut particulièrement permettre le décompte des sous-unités et l'étude de la stœchiométrie de canaux ioniques purifiés. Cette technique s'appuie sur l'interaction d'une pointe nanométrique fixée au bout d'un cantilever micrométrique avec la surface à explorer.

Un système piézoélectrique permet de bouger précisément (résolution  $< 1$  nm) le cantilever par rapport à la surface et donc d'obtenir la topologie de surface selon l'interaction avec la pointe (73). Des images obtenues par AFM ont par exemple révélé une stœchiométrie de  $2\alpha:2\beta:1\delta$ , placée dans l'ordre  $\alpha\beta\alpha\delta\beta$  (sens anti-horaire, vue du côté extracellulaire), pour les sous-unités  $\alpha_4\beta_3\delta$  des récepteurs GABA<sub>A</sub> (74). Pour différencier les sous-unités, un épitope distinct est ajouté à chacune d'elles. Un anticorps qui s'y lie spécifiquement est alors détecté par AFM, permettant d'étudier l'organisation en sous-unité.

La spectroscopie de fluorescence à l'échelle de la molécule unique peut quant à elle être utilisée aussi bien sur des canaux purifiés que sur de canaux exprimés à la membrane cellulaire. Contrairement à l'AFM, un marqueur fluorescent permet de les distinguer des autres composants cellulaires. Pour cette méthode, les sous-unités d'intérêt d'un canal sont spécifiquement marquées d'une molécule fluorescente. Lorsque la densité des canaux est suffisamment faible pour distinguer des canaux uniques, leur intensité de fluorescence est mesurée. Une première approximation du nombre de sous-unités marquées peut être obtenue simplement à partir de l'intensité, assumant que l'intensité d'une seule molécule fluorescente est connue (75). Cependant, une importante variabilité de l'intensité peut exister (76-78), se traduisant en des résultats peu précis. Plusieurs facteurs peuvent contribuer à faire varier l'intensité de la molécule fluorescente, notamment son environnement local ou une orientation préférentielle de son moment dipolaire. Des mesures de fluorescence en temps résolu permettent d'éviter ce problème. La trace de fluorescence met en évidence les événements de photoblanchiment (photodestruction) de chacune des molécules fluorescentes, qui provoquent une diminution de l'intensité de fluorescence en sauts discrets (Fig. 1.4). Le photoblanchiment se produit sur la molécule fluorescente excitée, alors qu'elle est chimiquement modifiée par l'interaction avec des molécules environnantes, généralement l'oxygène (79,80). Chacune de ces étapes correspond à une molécule fluorescente, et par extension, au nombre de sous-unités marquées.



**Figure 1.4** | Exemple de trace avec des sauts de photoblanchiment. Les flèches indiquent l'emplacement des sauts pour un tétramère où chacune des sous-unités est marquée. Les états de fluorescence sont aussi représentés par le nombre de molécules fluorescentes (vertes) et photoblanchies (noires).

En pratique, les sous-unités d'intérêt ne sont pas toutes marquées. Il est possible que la molécule fluorescente ait été photoblanchie avant la mesure ou qu'elle ne soit simplement pas fonctionnelle, comme c'est le cas pour une portion des protéines fluorescentes fusionnées génétiquement à des sous-unités. Donc même si des protéines fluorescentes sont nécessairement attachées aux sous-unités d'intérêt, certaines ne sont pas dans un état où le chromophore est mature (81). Pour les fluorophores organiques, leur liaison à la protéine dépend du rendement de la réaction entre le site de la protéine à marquer et le groupe réactif du fluorophore, normalement inférieur à 100% (82). En conséquence, pour un complexe composé de  $x$  sous-unités d'intérêt, la distribution de sous-unités marquées suit une distribution binomiale d'ordre  $x$  (83). L'analyse finale s'appuie donc sur cette distribution binomiale.

Cette technique de spectroscopie de fluorescence a été popularisée par une étude de stœchiométrie sur les récepteurs ionotropes NMDA (*N-methyl-D-aspartate*) exprimés à la membrane d'ovocytes de *Xenopus laevis* (83). De nombreux travaux utilisent maintenant cette méthode (84-89). Les ovocytes sont fréquemment utilisés pour ce type d'expérience, comparativement aux cellules mammifères, qui produisent généralement des résultats avec un important bruit de fluorescence. Cependant, l'organisation en sous-unités de protéines d'origine mammifère peut être différente lorsqu'exprimée en ovocyte, tel que démontré pour

le récepteur nicotinique de l'acetylcholine (90,91), compliquant ainsi l'interprétation des résultats.

Dans cette thèse, la méthode de décompte par photoblanchiment de molécules fluorescentes est d'abord appliquée sur une toxine formeuse de pores de *B. thuringiensis*. Contrairement aux canaux ioniques constitués de protéines transmembranaires, les toxines formeuses de pores sont solubles sous forme monomérique. Des changements de conformation permettent à certaines régions de s'insérer dans la membrane, et donc de former un pore composé de plusieurs monomères (92,93). Puisque les toxines formeuses de pores peuvent exister sous forme monomérique en solution, leur processus d'oligomérisation est particulièrement intrigant. Existe-t-il plusieurs conformations possibles? Est-ce qu'un pore oligomérique doit être formé avant l'insertion membranaire? Est-ce que la concentration de toxines influence l'oligomérisation? Ces questions peuvent être abordées par la technique de décompte de sous-unités fluorescentes. La toxine est marquée d'un fluorophore, purifiée et reconstituée dans des vésicules. Celles-ci forment des bicouches supportées à la surface de lamelles de verre, où l'émission de fluorescence est mesurée. Cette configuration simple a notamment l'avantage de produire des résultats avec très peu de bruit de fluorescence. La méthode de décompte des molécules fluorescentes est aussi appliquée directement sur des cellules mammifères exprimant des canaux liés à des protéines fluorescentes (sfGFP : *superfolder green fluorescent protein*). Pour rendre l'étude objective et précise dans un contexte où le bruit de fluorescence est important, un programme qui automatise l'analyse est alors développé. Celui-ci se charge de sélectionner les canaux marqués de molécules fluorescentes, filtrer leur fluorescence du bruit, détecter les événements de photoblanchiment et déterminer si la trace de fluorescence est de qualité suffisante pour être considérée dans l'analyse.

Les travaux présentés dans cette thèse mettent en évidence les phénomènes de regroupement et d'organisation des sous-unités au sein d'un canal ionique. Ces agencements sont essentiels aux fonctions de la machinerie biochimique de la cellule. Elles amènent aussi une autre question importante. Puisque la fonction des canaux émerge des interactions entre les monomères (sous-unités) qui forment le pore de conduction, est-ce possible que des canaux

en arrivent à interagir entre eux? Et quelle seraient alors les conséquences fonctionnelles de ces interactions? La prochaine section aborde ces questions.

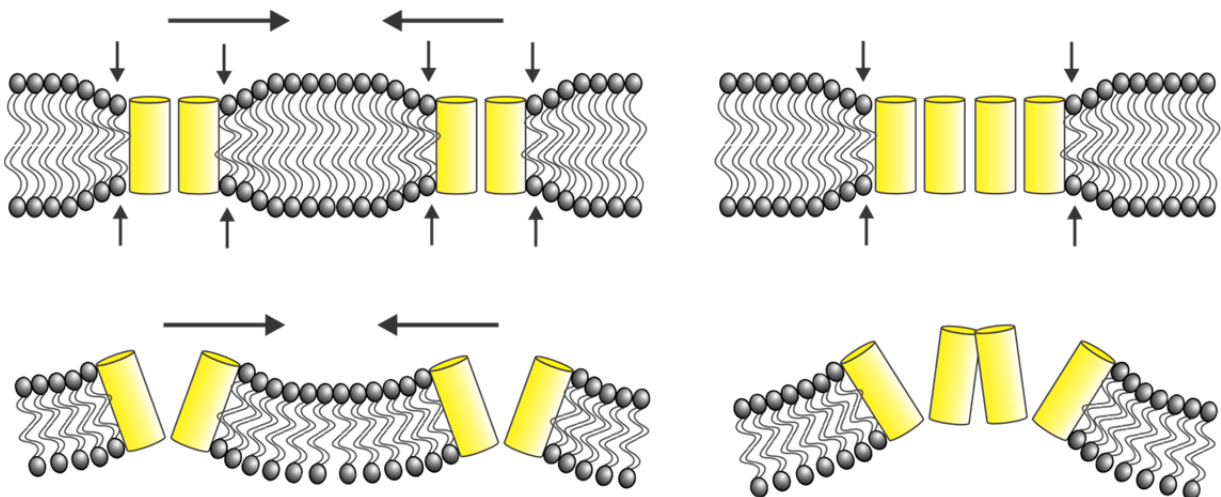
### 1.3 Regroupement de canaux ioniques

Les interactions protéine-protéine sont à la base de la stœchiométrie des canaux. De façon plus globale, ces interactions peuvent mener aussi à des regroupements plus importants en nombre. Les interactions protéine-protéine soutiennent un vaste réseau qui participe à divers mécanismes cellulaires essentiels. Un exemple bien connu est celui des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR : *G protein-coupled receptors*). L'interaction entre ce type de récepteur à la membrane et une protéine G à l'intérieur de la cellule permet de produire une cascade de signalisation cellulaire en réponse à la liaison extracellulaire d'un ligand spécifique au récepteur (94-96). Cette interaction est donc fondamentale à la transduction des signaux pour différentes fonctions physiologiques. D'autres interactions se produisant entre protéines sont cependant considérées pathologiques (97). C'est le cas de la maladie d'Alzheimer, où des lésions apparaissent suite à l'agrégation de peptides bêta-amyloïde, et aussi de protéines *tau* (98-100).

Dans le cas spécifique des canaux ioniques, plusieurs études amènent une vision plus globale des interactions protéine-protéine, alors que les canaux se réunissent parfois entre eux. Par exemple, plusieurs études électrophysiologiques où le nombre de canaux est estimé à différentes régions par *patch-clamp* montrent que différents canaux dans les neurones sont présents à haute densité à des régions spécifiques (101-108). Les canaux sodiques du sarcolemme des myocytes cardiaques ont aussi été observés en regroupement (109). Le même phénomène a aussi été observé pour différents canaux purifiés et reconstitué dans une membrane lipidique. C'est notamment le cas des canaux potassiques KcsA observés par fluorescence (110,111). Le rassemblement de canaux mécanosensibles MscL a aussi été détecté par fluorescence, en plus de mesures de distribution des canaux en *patch-clamp* et par AFM (112). Des mesures électrophysiologiques des canaux ioniques formés par l'antibiotique syringomycin E suggèrent aussi des associations de monomères (113).

Le regroupement de canaux ioniques semble pouvoir être causé par plusieurs facteurs. Le regroupement de récepteurs acétylcholine, et aussi de récepteurs glycine, a été

attribué à une protéine spécialisée, comme la gephyrin, qui les dirigerait vers une région spécifique (114,115). Les radeaux lipidiques semblent aussi influencer le rassemblement de différents canaux dans des microdomaines spécifiques (116-118). Il pourrait aussi y avoir des interactions homophiliques qui regroupent les canaux, tel que proposé pour la syntaxine (119). Une autre voie possible repose sur les propriétés physiques de la membrane lipidique. Plusieurs études démontrent qu'un rassemblement de protéines membranaires peut résulter d'une disparité entre l'épaisseur de la partie hydrophobique de la protéine et celle de la membrane (120-123). Un regroupement serait dans ce cas énergétiquement favorable étant donné la déformation impliquée pour éviter la disparité des régions hydrophobiques (Fig. 1.5). Le même phénomène se produit aussi selon le degré de courbure de la membrane (122,124). Des modèles théoriques prédisent d'ailleurs ces phénomènes (125-129).



**Figure 1.5** | Regroupements de canaux induits par la déformation de la membrane. En haut, une modification de l'épaisseur hydrophobique de la membrane pour accommoder des canaux. En bas, une courbure de membrane créée par la forme des canaux.

Le regroupement de canaux peut potentiellement affecter leur activité fonctionnelle. Par exemple, des mesures électrophysiologiques où deux canaux sodiques sont regroupés révèlent un couplage fonctionnel où l'ouverture de l'un est facilitée si le second est fermé (130). Aussi, l'association de deux canaux formés par la gramicidine A augmente la conductance de chacun des canaux par environ 10% (131). Il a aussi été proposé que l'assemblage de canaux formés par l'antibiotique syringomycin E est responsable de la

conductance élevée (113). L'interaction entre ces canaux pourrait alors mener à une ouverture et fermeture concertée de plusieurs canaux. Cette coopérativité de canaux regroupés a aussi été suggérée pour les canaux mécanosensibles à large conductance MscL (112).

Cette thèse présente une étude du regroupement par fluorométrie en voltage imposé de canaux potassiques KcsA reconstitués dans des bicouches lipidiques planaires. En mesurant la conduction ionique simultanément à la fluorescence, il est possible de corréler les observations relatives à la distribution spatiale des canaux dans la membrane à celles de la fonction de conduction. La configuration du système de mesure permet aussi de contrôler la composition lipidique où les canaux évoluent. Ainsi, en étudiant les phénomènes de regroupement de canaux ioniques par modulation de la composition lipidique, l'impact de différentes propriétés de membrane sur les canaux peut aussi être apprécié. Ce type de mesures combinées peut donc en principe décrire et corréler différents phénomènes associés aux propriétés de la membrane. Il est d'ailleurs de plus en plus reconnu que ces propriétés ont probablement un effet important dans la fonction des canaux ioniques. La section suivante introduit ces phénomènes pour mettre en contexte les résultats présentés dans cette thèse.

## **1.4 Régulation des canaux ioniques par les propriétés de membrane**

Puisque les lipides interagissent de très près avec différentes régions des canaux ioniques, ils jouent nécessairement un rôle au niveau de leur conformation (4). En plus de maintenir l'intégrité des canaux ioniques, les propriétés physico-chimiques de la membrane peuvent favoriser une certaine conformation et donc influencer leur fonction. La charge portée par les têtes polaires des phospholipides est notamment bien connue pour affecter les propriétés de conduction de plusieurs canaux ioniques. Plusieurs études rapportent une forte modulation fonctionnelle par le phospholipide chargé négativement *PIP2* (Phosphatidylinositol-4,5-diphosphate). Par exemple, plusieurs canaux potassiques à rectification entrante ( $K_{ir}$ ) sont activés par *PIP2* (132-134). Cependant, la charge elle-même n'est pas suffisante pour promouvoir l'ouverture des canaux  $K_{ir}$ . Il semble que plutôt que des interactions spécifiques entre *PIP2* et ces canaux soient formées et participent fortement aux mécanismes de régulation (135,136). De plus, une étude récente suggère que la sensibilité de



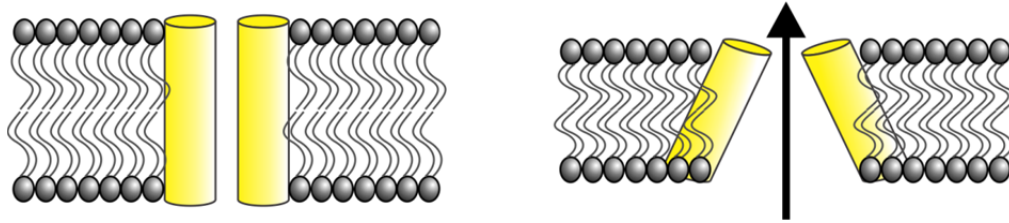
ce type de canal à *PIP2* puisse dépendre de la concentration d'un second phospholipide chargé négativement (135).

*PIP2* serait aussi nécessaire au maintien de l'activité de canaux calciques dépendants du voltage (137). Il permet également l'activation de canaux TRPM8 (138), un canal de type *transient receptor potential* sensible aux faibles températures et au menthol, et l'inhibition de canaux TRPV1, plutôt activés par la chaleur et la capsaïcine (139). Un lipide anionique serait aussi nécessaire pour la fonction du canal potassique KcsA (140,141). Dans le cas de canaux potassiques dépendants du voltage, les lipides anioniques supporteraient une activation à des potentiels membranaires plus faibles, alors que les lipides cationiques auraient l'effet inverse (142-145). Bien que ces effets fonctionnels ne soient généralement pas totalement compris au niveau moléculaire, des forces électrostatiques impliquant l'interaction avec des acides aminés chargés contribuent probablement à ces mécanismes. Par exemple, une étude récente du canal KcsA montre l'influence électrostatique entre une portion de la région N-terminale des sous-unités et les phospholipides du feuillet intracellulaire. Des acides aminés chargés positivement interagiraient avec les lipides chargés négativement pour stabiliser l'état ouvert du canal (146). Ce type d'interaction avec les lipides de la membrane se distingue des interactions où une molécule se lie spécifiquement au canal et participe à ses mécanismes d'ouverture, comme suggéré précédemment en ce qui concerne l'interaction entre *PIP2* et les canaux  $K_{ir}$ .

Une autre propriété de la membrane souvent reliée à la fonction de canaux ioniques est l'épaisseur de sa région hydrophobique. Par exemple, une étude électrophysiologique en *patch-clamp* de canaux ioniques formés par la gramicidine A montre un changement drastique fonctionnel selon une modification de la longueur des chaînes d'acides gras par deux carbones (147). Les bicouches où les chaînes d'acide gras possèdent 20 carbones révèlent des canaux activés par la pression, alors qu'ils sont inactivés par la pression si les chaînes sont plutôt de 18 carbones. Une autre étude montre que la conductance de canaux BK (canaux potassiques activés par le calcium à haute conductance) est modulée par l'épaisseur de la partie hydrophobique des membranes. Selon les bicouches examinées où les chaînes d'acides gras portent de 14 à 24 carbones, la conductance mesurée augmente pour les chaînes de 14 à 18 carbones et diminue pour les chaînes plus longues (148). La stabilité de l'état fermée en est également affectée et se traduit par une modulation de la probabilité d'ouverture, qui diminue

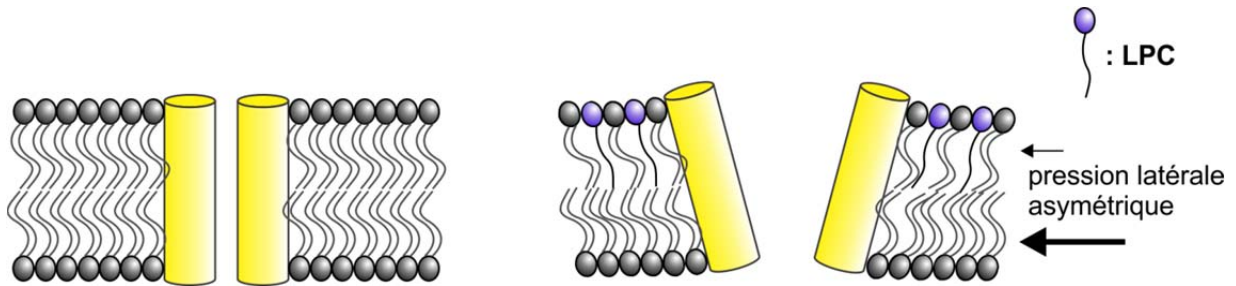
pour les chaînes de 14 à 22 carbones et augmente pour les chaînes plus longues (149). Dans un contexte similaire d'étude, l'énergie d'activation des canaux mécanosensible MscL semble diminuer avec une réduction de l'épaisseur de la région hydrophobique (150). Il est aussi possible que la fonction du canal potassique KcsA soit modulée par ce même paramètre. Des mesures récentes visant à déterminer l'activité du canal selon l'épaisseur de la région hydrophobique de la membrane suggèrent que les membranes composées de chaînes à 18 carbones sont activées légèrement plus facilement que celles avec 22 carbones. Une concentration plus élevée en proton est alors nécessaire pour activer le canal des membranes plus épaisses (151). Ces résultats semblent notamment supporter une étude concernant l'affinité entre le canal KcsA et des phospholipides de différentes longueurs de chaîne. Le canal fermé aurait une affinité plus grande aux longues chaînes (~22 carbones) qu'à celles plus courtes (14 carbones). Par contre, cette affinité semble s'inversée en conformation ouverte (152).

Ces modulations fonctionnelles découlent d'une modification structurale qui minimise la disparité entre les régions hydrophobiques de la bicouche et celles des canaux, étant donné le coût énergétique élevé pour exposer des interfaces polaires/non-polaires (153). Cette tendance à éviter la disparité hydrophobique est souvent décrite en assumant une protéine membranaire rigide et des lipides qui s'ajustent en conséquence (125,154,155). Cependant, bien que les lipides soient généralement plus souples et peuvent s'étirer ou se compresser plus facilement que les protéines, certains changements de conformation peuvent être favorisés. Ce phénomène est observé pour des protéines transmembranaires à hélices-alpha, alors qu'une très faible distorsion de la membrane est mesurée en les introduisant dans des membranes dont l'épaisseur de la région hydrophobique varie (152,156,157). L'adaptation des protéines à l'épaisseur de la région hydrophobique de la membrane lipidique pourrait se faire par inclinaison des hélices-alpha (158)(Fig. 1.6). Au contraire, pour des protéines rigides à hélices-bêta ( *$\beta$ -helical*) ou à barillet-bêta ( *$\beta$ -barrel*), une distorsion importante de la membrane est mesurée (123,159).



**Figure 1.6** | Illustration d'un phénomène de modulation fonctionnel par l'épaisseur de la partie hydrophobique de la membrane. Dans l'exemple illustré, l'adaptation du canal à une région hydrophobique plus mince par inclinaison des hélices augmente la conduction ionique, représentée par la flèche dans le pore.

Des effets au niveau de la conformation des canaux ioniques peuvent aussi émerger de façon plus générale des propriétés mécaniques des lipides et de la pression ou tension exercée latéralement par ces derniers (160). Les effets sont particulièrement perceptibles pour les canaux mécanosensibles. Une étude sur le canal MscL s'appuie sur la création d'une asymétrie membranaire via l'addition de lysophosphatidylcholine (LPC), un phospholipide où une des deux chaînes aliphatiques est absente. Cette asymétrie permet de provoquer l'ouverture du canal à elle seule (150). La lysophosphatidylcholine n'a pas tendance à former des bicouches planaires, mais plutôt à courber la membrane. La tension naturelle créée par ce phospholipide tend donc à déformer la bicouche (161). L'asymétrie modifie donc le profil de pression latérale et favorise l'état ouvert du canal MscL (Fig. 1.7). Des effets fonctionnels sont aussi suggérés pour quelques autres types de canaux alors que différents agents ont été insérés dans la membrane lipidique pour modifier ses attributs mécaniques. C'est notamment le cas de canaux sodiques dépendants du voltage, dont l'inactivation est modifiée par le cholestérol et la capsaïcine (162,163). L'amplitude de cette modification varie selon l'effet des molécules sur la membrane. La capsaïcine, qui rend la bicouche plus fluide, déplace la courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs, alors que le cholestérol, qui rend la bicouche moins flexible, a l'effet contraire. Il a été également proposé que la nicotine puisse inhiber des canaux sodiques dépendants du voltage et sensibiliser des canaux TRPV1 activés par la capsaïcine par modulation de la membrane lipidique (164).



**Figure 1.7** | Profil de pression latérale asymétrique induit par la présence de molécules de lysophosphatidylcholine (LPC) d'un seul côté de la membrane. La pression des lipides sur le canal étant plus forte du côté sans LPC, la conformation du canal peut en être affectée.

## 1.5 Format de la thèse

Cette thèse présente deux articles publiés et un article soumis pour publication. Ils s'appuient tous sur la spectroscopie de fluorescence à l'échelle de la molécule unique pour répondre à des questions d'ordre structurale relativement aux canaux ioniques. L'ensemble des travaux s'intéresse aux phénomènes d'association de monomères qui forment des canaux ioniques ou des complexes de canaux. Les chapitres 3 et 4 concernent principalement le dénombrement de sous-unités composant un canal ionique par photoblanchiment des molécules fluorescentes. Le chapitre 3 évalue plus précisément l'oligomérisation d'une toxine formeuse de pore dans une membrane lipidique selon la concentration. Cette étude est à notre connaissance la première à employer la technique de décompte de sous-unités fluorescentes pour décrire une dynamique d'oligomérisation. Le chapitre 4 présente quant à lui un développement d'une nouvelle méthode informatique pour analyser les résultats de photoblanchiment même en présence d'un important bruit de fluorescence. Le programme créé est utilisé pour confirmer l'organisation en sous-unités des récepteurs ionotropes au glutamate et à la glycine. Au chapitre 5, le principe d'association de sous-unités est amené à un degré d'oligomérisation plus important alors que les interactions et le regroupement de canaux KcsA sont étudiés en bicouche lipidique plane. Dans ce contexte d'assemblage de canaux ioniques, les effets de l'épaisseur de la région hydrophobe de la membrane sont explorés. La fonction des canaux KcsA est aussi étudiée en présence de canaux assemblés, de même qu'en variant la composition lipidique.

Avant la présentation de ces travaux, le prochain chapitre expose les bases théoriques essentielles utilisées et met en contexte certains éléments des méthodes développées.

## 1.6 Bibliographie

1. Alberts, B., Jonhson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002) *Molecular biology of the cell*, Fourth ed., Garland Science, New York, U.S.A.
2. Hille, B. (2001) *Ion channels of excitable membranes*, Third ed., Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, U.S.A.
3. Latorre, R., and Miller, C. (1983) Conduction and selectivity in potassium channels. *J. Membrin Biol.* **71**, 11-30
4. White, S. H., and Wimley, W. C. (1999) MEMBRANE PROTEIN FOLDING AND STABILITY: Physical Principles. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **28**, 319-365
5. Schrempf, H., Schmidt, O., Kummerlen, R., Hinnah, S., Muller, D., Betzler, M., Steinkamp, T., and Wagner, R. (1995) A prokaryotic potassium ion channel with two predicted transmembrane segments from *Streptomyces lividans*. *The EMBO journal* **14**, 5170-5178
6. 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<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science* **280**, 69-77
7. Aqvist, J., and Luzhkov, V. (2000) Ion permeation mechanism of the potassium channel. *Nature* **404**, 881-884
8. Berneche, S., and Roux, B. (2000) Molecular dynamics of the KcsA K(+) channel in a bilayer membrane. *Biophysical journal* **78**, 2900-2917
9. Noskov, S. Y., Berneche, S., and Roux, B. (2004) Control of ion selectivity in potassium channels by electrostatic and dynamic properties of carbonyl ligands. *Nature* **431**, 830-834
10. Berneche, S., and Roux, B. (2001) Energetics of ion conduction through the K<sup>+</sup> channel. *Nature* **414**, 73-77
11. Uysal, S., Vasquez, V., Tereshko, V., Esaki, K., Fellouse, F. A., Sidhu, S. S., Koide, S., Perozo, E., and Kossiakoff, A. (2009) Crystal structure of full-length KcsA in its closed conformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 6644-6649

12. Uysal, S., Cuello, L. G., Cortes, D. M., Koide, S., Kossiakoff, A. A., and Perozo, E. (2011) Mechanism of activation gating in the full-length KcsA K<sup>+</sup> channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 11896-11899
13. Carpenter, E. P., Beis, K., Cameron, A. D., and Iwata, S. (2008) Overcoming the challenges of membrane protein crystallography. *Current opinion in structural biology* **18**, 581-586
14. Kawate, T., Michel, J. C., Birdsong, W. T., and Gouaux, E. (2009) Crystal structure of the ATP-gated P2X<sub>4</sub> ion channel in the closed state. *Nature* **460**, 592-598
15. Long, S. B., Campbell, E. B., and MacKinnon, R. (2005) Crystal Structure of a Mammalian Voltage-Dependent Shaker Family K<sup>+</sup> Channel. *Science* **309**, 897-903
16. Unwin, N. (2005) Refined Structure of the Nicotinic Acetylcholine Receptor at 4Å Resolution. *Journal of molecular biology* **346**, 967-989
17. Maeda, S., Nakagawa, S., Suga, M., Yamashita, E., Oshima, A., Fujiyoshi, Y., and Tsukihara, T. (2009) Structure of the connexin 26 gap junction channel at 3.5[thinsp]Å resolution. *Nature* **458**, 597-602
18. Song, L., Hobaugh, M. R., Shustak, C., Cheley, S., Bayley, H., and Gouaux, J. E. (1996) Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science* **274**, 1859-1866
19. Yamashita, K., Kawai, Y., Tanaka, Y., Hirano, N., Kaneko, J., Tomita, N., Ohta, M., Kamio, Y., Yao, M., and Tanaka, I. (2011) Crystal structure of the octameric pore of staphylococcal  $\gamma$ -hemolysin reveals the  $\beta$ -barrel pore formation mechanism by two components. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 17314-17319
20. Nicke, A., Baumert, H. G., Rettinger, J., Eichele, A., Lambrecht, G., Mutschler, E., and Schmalzing, G. (1998) P2X<sub>1</sub> and P2X<sub>3</sub> receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *The EMBO journal* **17**, 3016-3028
21. Liman, E. R., Tytgat, J., and Hess, P. (1992) Subunit stoichiometry of a mammalian K<sup>+</sup> channel determined by construction of multimeric cDNAs. *Neuron* **9**, 861-871
22. Lee, S.-Y., Lee, A., Chen, J., and MacKinnon, R. (2005) Structure of the KvAP voltage-dependent K<sup>+</sup> channel and its dependence on the lipid membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 15441-15446
23. Raab-Graham, K. F., and Vandenberg, C. A. (1998) Tetrameric Subunit Structure of the Native Brain Inwardly Rectifying Potassium Channel Kir 2.2. *J Biol Chem* **273**, 19699-19707

24. Tao, X., Avalos, J. L., Chen, J., and MacKinnon, R. (2009) Crystal Structure of the Eukaryotic Strong Inward-Rectifier K<sup>+</sup> Channel Kir2.2 at 3.1 Å Resolution. *Science* **326**, 1668-1674
25. Zagotta, W. N., Olivier, N. B., Black, K. D., Young, E. C., Olson, R., and Gouaux, E. (2003) Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels. *Nature* **425**, 200-205
26. Weitz, D., Ficek, N., Kremmer, E., Bauer, P. J., and Kaupp, U. B. (2002) Subunit Stoichiometry of the CNG Channel of Rod Photoreceptors. *Neuron* **36**, 881-889
27. Kedei, N., Szabo, T., Lile, J. D., Treanor, J. J., Olah, Z., Iadarola, M. J., and Blumberg, P. M. (2001) Analysis of the Native Quaternary Structure of Vanilloid Receptor 1. *J Biol Chem* **276**, 28613-28619
28. Rosenmund, C., Stern-Bach, Y., and Stevens, C. F. (1998) The Tetrameric Structure of a Glutamate Receptor Channel. *Science* **280**, 1596-1599
29. Sobolevsky, A. I., Rosconi, M. P., and Gouaux, E. (2009) X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. *Nature* **462**, 745-756
30. 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
31. Payandeh, J., Scheuer, T., Zheng, N., and Catterall, W. A. (2011) The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature* **475**, 353-358
32. Takahashi, M., Seagar, M. J., Jones, J. F., Reber, B. F., and Catterall, W. A. (1987) Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **84**, 5478-5482
33. Nicke, A., Rettinger, J., Mutschler, E., and Schmalzing, G. (1999) Blue native PAGE as a useful method for the analysis of the assembly of distinct combinations of nicotinic acetylcholine receptor subunits. *Journal of receptor and signal transduction research* **19**, 493-507
34. McGuire, H., Arousseau, M. R. P., Bowie, D., and Blunck, R. (2012) Automating Single Subunit Counting of Membrane Proteins in Mammalian Cells. *J Biol Chem* **287**, 35912-35921
35. Brejc, K., van Dijk, W. J., Klaassen, R. V., Schuurmans, M., van der Oost, J., Smit, A. B., and Sixma, T. K. (2001) Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature* **411**, 269-276

36. Unwin, P. N. T., and Zampighi, G. (1980) Structure of the junction between communicating cells. *Nature* **283**, 545-549
37. Gouaux, J. E., Braha, O., Hobaugh, M. R., Song, L., Cheley, S., Shustak, C., and Bayley, H. (1994) Subunit stoichiometry of staphylococcal alpha-hemolysin in crystals and on membranes: a heptameric transmembrane pore. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**, 12828-12831
38. Krasilnikov, O. V., Merzlyak, P. G., Yuldasheva, L. N., Rodrigues, C. G., Bhakdi, S., and Valeva, A. (2000) Electrophysiological evidence for heptameric stoichiometry of ion channels formed by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin in planar lipid bilayers. *Molecular Microbiology* **37**, 1372-1378
39. Miles, G., Movileanu, L., and Bayley, H. (2002) Subunit composition of a bicomponent toxin: staphylococcal leukocidin forms an octameric transmembrane pore. *Protein science : a publication of the Protein Society* **11**, 894-902
40. Lacy, D. B., Wigelsworth, D. J., Melnyk, R. A., Harrison, S. C., and Collier, R. J. (2004) Structure of heptameric protective antigen bound to an anthrax toxin receptor: A role for receptor in pH-dependent pore formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 13147-13151
41. Kintzer, A. F., Sterling, H. J., Tang, II, Abdul-Gader, A., Miles, A. J., Wallace, B. A., Williams, E. R., and Krantz, B. A. (2010) Role of the protective antigen octamer in the molecular mechanism of anthrax lethal toxin stabilization in plasma. *Journal of molecular biology* **399**, 741-758
42. Kintzer, A. F., Sterling, H. J., Tang, II, Williams, E. R., and Krantz, B. A. (2010) Anthrax toxin receptor drives protective antigen oligomerization and stabilizes the heptameric and octameric oligomer by a similar mechanism. *PLoS One* **5**, e13888
43. Kintzer, A. F., Thoren, K. L., Sterling, H. J., Dong, K. C., Feld, G. K., Tang, II, Zhang, T. T., Williams, E. R., Berger, J. M., and Krantz, B. A. (2009) The protective antigen component of anthrax toxin forms functional octameric complexes. *Journal of molecular biology* **392**, 614-629
44. Zagotta, W. N., Hoshi, T., and Aldrich, R. W. (1994) Shaker potassium channel gating. III: Evaluation of kinetic models for activation. *The Journal of general physiology* **103**, 321-362
45. Schoppa, N. E., and Sigworth, F. J. (1998) Activation of Shaker Potassium Channels : III. An Activation Gating Model for Wild-Type and V2 Mutant Channels. *The Journal of general physiology* **111**, 313-342
46. Bezanilla, F. (2005) Voltage-gated ion channels. *IEEE transactions on nanobioscience* **4**, 34-48



47. Chanda, B., Asamoah, O. K., and Bezanilla, F. (2004) Coupling Interactions between Voltage Sensors of the Sodium Channel as Revealed by Site-specific Measurements. *The Journal of general physiology* **123**, 217-230
48. Armstrong, C. M. (2006) Na channel inactivation from open and closed states. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 17991-17996
49. Taylor, W. R., and Baylor, D. A. (1995) Conductance and kinetics of single cGMP-activated channels in salamander rod outer segments. *The Journal of physiology* **483**, 567-582
50. Chapman, M. L., VanDongen, H. M. A., and VanDongen, A. M. J. (1997) Activation-Dependent Subconductance Levels in the drk1 K Channel Suggest a Subunit Basis for Ion Permeation and Gating. *Biophysical journal* **72**, 708-719
51. Zheng, J., and Sigworth, F. J. (1998) Intermediate Conductances during Deactivation of Heteromultimeric Shaker Potassium Channels. *The Journal of general physiology* **112**, 457-474
52. Shapovalov, G., and Lester, H. A. (2004) Gating Transitions in Bacterial Ion Channels Measured at 3  $\mu$ s Resolution. *The Journal of general physiology* **124**, 151-161
53. Chapman, M. L., and VanDongen, A. M. (2005) K channel subconductance levels result from heteromeric pore conformations. *The Journal of general physiology* **126**, 87-103
54. Fisher, J. L., and Mott, D. D. (2012) The Auxiliary Subunits Neto1 and Neto2 Reduce Voltage-Dependent Inhibition of Recombinant Kainate Receptors. *The Journal of Neuroscience* **32**, 12928-12933
55. Barrera, N. P., Henderson, R. M., Murrell-Lagnado, R. D., and Edwardson, J. M. (2007) The Stoichiometry of P2X2/6 Receptor Heteromers Depends on Relative Subunit Expression Levels. *Biophysical journal* **93**, 505-512
56. Durisic, N., Godin, A. G., Wever, C. M., Heyes, C. D., Lakadamyali, M., and Dent, J. A. (2012) Stoichiometry of the Human Glycine Receptor Revealed by Direct Subunit Counting. *The Journal of Neuroscience* **32**, 12915-12920
57. Cui, C., and Mayer, M. L. (1999) Heteromeric Kainate Receptors Formed by the Coassembly of GluR5, GluR6, and GluR7. *The Journal of Neuroscience* **19**, 8281-8291
58. Herb, A., Burnashev, N., Werner, P., Sakmann, B., Wisden, W., and Seeburg, P. H. (1992) The KA-2 subunit of excitatory amino acid receptors shows widespread expression in brain and forms ion channels with distantly related subunits. *Neuron* **8**, 775-785

59. Jaskolski, F., Coussen, F., and Mulle, C. (2005) Subcellular localization and trafficking of kainate receptors. *Trends in pharmacological sciences* **26**, 20-26
60. Egan, T. M., and Khakh, B. S. (2004) Contribution of Calcium Ions to P2X Channel Responses. *The Journal of Neuroscience* **24**, 3413-3420
61. Schagger, H., Cramer, W. A., and von Jagow, G. (1994) Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Analytical biochemistry* **217**, 220-230
62. Schagger, H., and von Jagow, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical biochemistry* **199**, 223-231
63. Pan, J.-Y., Li, H., Ma, Y., Chen, P., Zhao, P., Wang, S.-Y., and Peng, X.-X. (2010) Complexome of Escherichia coli Envelope Proteins under Normal Physiological Conditions. *Journal of Proteome Research* **9**, 3730-3740
64. Stenberg, F., Chovanec, P., Maslen, S. L., Robinson, C. V., Ilag, L. L., von Heijne, G., and Daley, D. O. (2005) Protein Complexes of the Escherichia coli Cell Envelope. *J Biol Chem* **280**, 34409-34419
65. Heuberger, E. H., Veenhoff, L. M., Duurkens, R. H., Friesen, R. H., and Poolman, B. (2002) Oligomeric state of membrane transport proteins analyzed with blue native electrophoresis and analytical ultracentrifugation. *Journal of molecular biology* **317**, 591-600
66. Wittig, I., Beckhaus, T., Wumaier, Z., Karas, M., and Schagger, H. (2010) Mass estimation of native proteins by blue native electrophoresis: principles and practical hints. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **9**, 2149-2161
67. Kumar, J., Schuck, P., and Mayer, M. L. (2011) Structure and assembly mechanism for heteromeric kainate receptors. *Neuron* **71**, 319-331
68. Reynolds, J. A., and Tanford, C. (1976) Determination of molecular weight of the protein moiety in protein-detergent complexes without direct knowledge of detergent binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **73**, 4467-4470
69. Mignen, O., Thompson, J. L., and Shuttleworth, T. J. (2008) Orail subunit stoichiometry of the mammalian CRAC channel pore. *The Journal of physiology* **586**, 419-425
70. Rambhadran, A., Gonzalez, J., and Jayaraman, V. (2010) Subunit arrangement in N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors. *J Biol Chem* **285**, 15296-15301

71. Zheng, J., Trudeau, M. C., and Zagotta, W. N. (2002) Rod cyclic nucleotide-gated channels have a stoichiometry of three CNGA1 subunits and one CNGB1 subunit. *Neuron* **36**, 891-896
72. Lakowicz, J. R. (2006) *Principles of fluorescence spectroscopy*, Third ed., Springer Science+Business Media,LLC, New York, NY, U.S.A.
73. Ando, T., Uchihashi, T., and Fukuma, T. (2008) High-speed atomic force microscopy for nano-visualization of dynamic biomolecular processes. *Progress in Surface Science* **83**, 337-437
74. Barrera, N. P., Betts, J., You, H., Henderson, R. M., Martin, I. L., Dunn, S. M. J., and Edwardson, J. M. (2008) Atomic Force Microscopy Reveals the Stoichiometry and Subunit Arrangement of the  $\alpha 4\beta 3\delta$  GABAA Receptor. *Mol. Pharmacol.* **73**, 960-967
75. Leake, M. C., Chandler, J. H., Wadhams, G. H., Bai, F., Berry, R. M., and Armitage, J. P. (2006) Stoichiometry and turnover in single, functioning membrane protein complexes. *Nature* **443**, 355-358
76. Ding, H., Wong, P. T., Lee, E. L., Gafni, A., and Steel, D. G. (2009) Determination of the Oligomer Size of Amyloidogenic Protein  $\beta$ -Amyloid(1-40) by Single-Molecule Spectroscopy. *Biophysical journal* **97**, 912-921
77. Lenn, T., Gkekas, C. N., Bernard, L., Engl, C., Jovanovic, G., Buck, M., and Ying, L. (2011) Measuring the stoichiometry of functional PspA complexes in living bacterial cells by single molecule photobleaching. *Chemical Communications* **47**, 400-402
78. Garcia, Hernan G., Lee, Heun J., Boedicker, James Q., and Phillips, R. (2011) Comparison and Calibration of Different Reporters for Quantitative Analysis of Gene Expression. *Biophysical journal* **101**, 535-544
79. Deschenes, L. A., and Vanden Bout, D. A. (2002) Single molecule photobleaching: increasing photon yield and survival time through suppression of two-step photolysis. *Chemical Physics Letters* **365**, 387-395
80. English, D. S., Furube, A., and Barbara, P. F. (2000) Single-molecule spectroscopy in oxygen-depleted polymer films. *Chemical Physics Letters* **324**, 15-19
81. Craggs, T. D. (2009) Green fluorescent protein: structure, folding and chromophore maturation. *Chemical Society Reviews* **38**, 2865-2875
82. Kim, Y., Ho, S. O., Gassman, N. R., Korlann, Y., Landorf, E. V., Collart, F. R., and Weiss, S. (2008) Efficient Site-Specific Labeling of Proteins via Cysteines. *Bioconjugate Chemistry* **19**, 786-791
83. Ulbrich, M. H., and Isacoff, E. Y. (2007) Subunit counting in membrane-bound proteins. *Nature methods* **4**, 319-321

84. Park, M., Kim, H.-H., Kim, D., and Song, N. W. (2005) Counting the Number of Fluorophores Labeled in Biomolecules by Observing the Fluorescence-Intensity Transient of a Single Molecule. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **78**, 1612-1618
85. Das, S. K., Darshi, M., Cheley, S., Wallace, M. I., and Bayley, H. (2007) Membrane Protein Stoichiometry Determined from the Step-Wise Photobleaching of Dye-Labelled Subunits. *ChemBioChem* **8**, 994-999
86. Blunck, R., McGuire, H., Hyde, H. C., and Bezanilla, F. (2008) Fluorescence detection of the movement of single KcsA subunits reveals cooperativity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 20263-20268
87. Shu, D., Zhang, H., Jin, J., and Guo, P. (2007) Counting of six pRNAs of phi29 DNA-packaging motor with customized single-molecule dual-view system. *The EMBO journal* **26**, 527-537
88. Simonson, P. D., Deberg, H. A., Ge, P., Alexander, J. K., Jeyifous, O., Green, W. N., and Selvin, P. R. (2010) Counting bungarotoxin binding sites of nicotinic acetylcholine receptors in mammalian cells with high signal/noise ratios. *Biophysical journal* **99**, L81-83
89. Reiner, A., Arant, R. J., and Isacoff, E. Y. (2012) Assembly stoichiometry of the GluK2/GluK5 kainate receptor complex. *Cell Rep* **1**, 234-240
90. Sivilotti, L. G., McNeil, D. K., Lewis, T. M., Nassar, M. A., Schoepfer, R., and Colquhoun, D. (1997) Recombinant nicotinic receptors, expressed in *Xenopus* oocytes, do not resemble native rat sympathetic ganglion receptors in single-channel behaviour. *The Journal of physiology* **500 ( Pt 1)**, 123-138
91. Krashia, P., Moroni, M., Broadbent, S., Hofmann, G., Kracun, S., Beato, M., Groot-Kormelink, P. J., and Sivilotti, L. G. (2010) Human  $\alpha 3\beta 4$  Neuronal Nicotinic Receptors Show Different Stoichiometry if They Are Expressed in *Xenopus* Oocytes or Mammalian HEK293 Cells. *PLoS ONE* **5**, e13611
92. Parker, M. W., and Feil, S. C. (2005) Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **88**, 91-142
93. Mueller, M., Grauschopf, U., Maier, T., Glockshuber, R., and Ban, N. (2009) The structure of a cytolytic [agr]-helical toxin pore reveals its assembly mechanism. *Nature* **459**, 726-730
94. Ritter, S. L., and Hall, R. A. (2009) Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 819-830
95. Kobilka, B. K. (2007) G protein coupled receptor structure and activation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1768**, 794-807

96. Lagerstrom, M. C., and Schioth, H. B. (2008) Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **7**, 339-357
97. Aguzzi, A., and O'Connor, T. (2010) Protein aggregation diseases: pathogenicity and therapeutic perspectives. *Nat Rev Drug Discov* **9**, 237-248
98. Ferrer, I. (2014) Cannabinoids for treatment of Alzheimer's disease: moving towards the clinic. *Frontiers in pharmacology* **5**
99. Jellinger, K. A., Janetzky, B., Attems, J., and Kienzl, E. (2008) Biomarkers for early diagnosis of Alzheimer disease: 'ALZheimer ASsociated gene'— a new blood biomarker? *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **12**, 1094-1117
100. Masters, C. L., Simms, G., Weinman, N. A., Multhaup, G., McDonald, B. L., and Beyreuther, K. (1985) Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **82**, 4245-4249
101. Almers, W., and Stirling, C. (1984) Distribution of transport proteins over animal cell membranes. *J. Membrin Biol.* **77**, 169-186
102. Poo, M. M. (1985) Mobility and Localization of Proteins in Excitable Membranes. *Annual Review of Neuroscience* **8**, 369-406
103. Thompson, S., and Coombs, J. (1988) Spatial distribution of Ca currents in molluscan neuron cell bodies and regional differences in the strength of inactivation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **8**, 1929-1939
104. Rasband, M. N., Trimmer, J. S., Schwarz, T. L., Levinson, S. R., Ellisman, M. H., Schachner, M., and Shrager, P. (1998) Potassium Channel Distribution, Clustering, and Function in Remyelinating Rat Axons. *The Journal of Neuroscience* **18**, 36-47
105. Van Wart, A., Trimmer, J. S., and Matthews, G. (2007) Polarized distribution of ion channels within microdomains of the axon initial segment. *The Journal of Comparative Neurology* **500**, 339-352
106. Lorincz, A., and Nusser, Z. (2008) Cell-Type-Dependent Molecular Composition of the Axon Initial Segment. *The Journal of Neuroscience* **28**, 14329-14340
107. Wang, S. S., and Thompson, S. (1992) A-type potassium channel clusters revealed using a new statistical analysis of loose patch data. *Biophysical journal* **63**, 1018-1025
108. King, A. N., Manning, C. F., and Trimmer, J. S. (2014) A unique ion channel clustering domain on the axon initial segment of mammalian neurons. *Journal of Comparative Neurology*, n/a-n/a

109. Bhargava, A., Lin, X., Novak, P., Mehta, K., Korchev, Y., Delmar, M., and Gorelik, J. (2013) Super-resolution Scanning Patch Clamp Reveals Clustering of Functional Ion Channels in Adult Ventricular Myocyte. *Circulation Research* **112**, 1112-1120
110. Molina, M. L., Barrera, F. N., Fernandez, A. M., Poveda, J. A., Renart, M. L., Encinar, J. A., Riquelme, G., and Gonzalez-Ros, J. M. (2006) Clustering and coupled gating modulate the activity in KcsA, a potassium channel model. *J Biol Chem* **281**, 18837-18848
111. Bolivar, J. H., East, J. M., Marsh, D., and Lee, A. G. (2012) Effects of Lipid Structure on the State of Aggregation of Potassium Channel KcsA. *Biochemistry* **51**, 6010-6016
112. Grage, S. L., Keleshian, A. M., Turdzieladze, T., Battle, A. R., Tay, W. C., May, R. P., Holt, S. A., Contera, S. A., Haertlein, M., Moulin, M., Pal, P., Rohde, P. R., Forsyth, V. T., Watts, A., Huang, K. C., Ulrich, A. S., and Martinac, B. (2011) Bilayer-mediated clustering and functional interaction of MscL channels. *Biophysical journal* **100**, 1252-1260
113. Kaulin, Y. A., Schagina, L. V., Bezrukov, S. M., Malev, V. V., Feigin, A. M., Takemoto, J. Y., Teeter, J. H., and Brand, J. G. (1998) Cluster organization of ion channels formed by the antibiotic syringomycin E in bilayer lipid membranes. *Biophysical journal* **74**, 2918-2925
114. Colledge, M., and Froehner, S. C. (1998) To muster a cluster: Anchoring neurotransmitter receptors at synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 3341-3343
115. Feng, G., TINTRUP, H., KIRSCH, J., NICHOL, M. C., KUHSE, J., BETZ, H., and SANES, J. R. (1998) Dual Requirement for Gephyrin in Glycine Receptor Clustering and Molybdoenzyme Activity. *Science* **282**, 1321-1324
116. Dalskov, S.-M., Immerdal, L., Niels-Christiansen, L.-L., Hansen, G. H., Schousboe, A., and Danielsen, E. M. (2005) Lipid raft localization of GABAA receptor and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in discrete microdomain clusters in rat cerebellar granule cells. *Neurochemistry International* **46**, 489-499
117. Robinson, P., Etheridge, S., Song, L., Armenise, P., Jones, O. T., and Fitzgerald, E. M. (2010) Formation of N-type (Cav2.2) voltage-gated calcium channel membrane microdomains: Lipid raft association and clustering. *Cell Calcium* **48**, 183-194
118. Pristerà, A., Baker, M. D., and Okuse, K. (2012) Association between Tetrodotoxin Resistant Channels and Lipid Rafts Regulates Sensory Neuron Excitability. *PLoS ONE* **7**, e40079
119. Sieber, J. J., Willig, K. I., Kutzner, C., Gerding-Reimers, C., Harke, B., Donnert, G., Rammner, B., Eggeling, C., Hell, S. W., Grubmüller, H., and Lang, T. (2007) Anatomy

- and Dynamics of a Supramolecular Membrane Protein Cluster. *Science* **317**, 1072-1076
120. Lewis, B. A., and Engelman, D. M. (1983) Bacteriorhodopsin remains dispersed in fluid phospholipid bilayers over a wide range of bilayer thicknesses. *Journal of molecular biology* **166**, 203-210
  121. Sparr, E., Ash, W. L., Nazarov, P. V., Rijkers, D. T., Hemminga, M. A., Tieleman, D. P., and Killian, J. A. (2005) Self-association of transmembrane alpha-helices in model membranes: importance of helix orientation and role of hydrophobic mismatch. *J Biol Chem* **280**, 39324-39331
  122. Botelho, A. V., Huber, T., Sakmar, T. P., and Brown, M. F. (2006) Curvature and hydrophobic forces drive oligomerization and modulate activity of rhodopsin in membranes. *Biophysical journal* **91**, 4464-4477
  123. Harroun, T. A., Heller, W. T., Weiss, T. M., Yang, L., and Huang, H. W. (1999) Experimental evidence for hydrophobic matching and membrane-mediated interactions in lipid bilayers containing gramicidin. *Biophysical journal* **76**, 937-945
  124. Reynwar, B. J., Illya, G., Harmandaris, V. A., Muller, M. M., Kremer, K., and Deserno, M. (2007) Aggregation and vesiculation of membrane proteins by curvature-mediated interactions. *Nature* **447**, 461-464
  125. Mouritsen, O. G., and Bloom, M. (1984) Mattress model of lipid-protein interactions in membranes. *Biophysical journal* **46**, 141-153
  126. Dan, N., Berman, A., Pincus, P., and Safran, S. A. (1994) Membrane-Induced Interactions between Inclusions. *J Phys Li* **4**, 1713-1725
  127. Dan, N., Pincus, P., and Safran, S. A. (1993) Membrane-Induced Interactions between Inclusions. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **9**, 2768-2771
  128. Kralchevsky, P. A., Paunov, V. N., Denkov, N. D., and Nagayama, K. (1995) Stresses in Lipid-Membranes and Interactions between Inclusions. *J Chem Soc Faraday T* **91**, 3415-3432
  129. Parton, D. L., Klingelhoefer, J. W., and Sansom, M. S. (2011) Aggregation of model membrane proteins, modulated by hydrophobic mismatch, membrane curvature, and protein class. *Biophysical journal* **101**, 691-699
  130. Iwasa, K., Ehrenstein, G., Moran, N., and Jia, M. (1986) Evidence for interactions between batrachotoxin-modified channels in hybrid neuroblastoma cells. *Biophysical journal* **50**, 531-537

131. Goforth, R. L., Chi, A. K., Greathouse, D. V., Providence, L. L., Koeppe, R. E., and Andersen, O. S. (2003) Hydrophobic Coupling of Lipid Bilayer Energetics to Channel Function. *The Journal of general physiology* **121**, 477-493
132. Hilgemann, D. W., and Ball, R. (1996) Regulation of cardiac Na<sup>+</sup>,Ca<sup>2+</sup> exchange and KATP potassium channels by PIP<sub>2</sub>. *Science* **273**, 956-959
133. Fan, Z., and Makielski, J. C. (1997) Anionic Phospholipids Activate ATP-sensitive Potassium Channels. *J Biol Chem* **272**, 5388-5395
134. Huang, C.-L., Feng, S., and Hilgemann, D. W. (1998) Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP<sub>2</sub> and its stabilization by G[β][γ]. *Nature* **391**, 803-806
135. D'Avanzo, N., Lee, S.-J., Cheng, W. W. L., and Nichols, C. G. (2013) Energetics and Location of Phosphoinositide Binding in Human Kir2.1 Channels. *J Biol Chem* **288**, 16726-16737
136. Whorton, M. R., and MacKinnon, R. (2013) X-ray structure of the mammalian GIRK2-[β][γ] G-protein complex. *Nature* **498**, 190-197
137. 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)P<sub>2</sub>. *Nature* **419**, 947-952
138. Liu, B., and Qin, F. (2005) Functional control of cold- and menthol-sensitive TRPM8 ion channels by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **25**, 1674-1681
139. Liu, B., Zhang, C., and Qin, F. (2005) Functional recovery from desensitization of vanilloid receptor TRPV1 requires resynthesis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **25**, 4835-4843
140. Heginbotham, L., Kolmakova-Partensky, L., and Miller, C. (1998) Functional reconstitution of a prokaryotic K<sup>+</sup> channel. *The Journal of general physiology* **111**, 741-749
141. Valiyaveetil, F. I., Zhou, Y., and MacKinnon, R. (2002) Lipids in the structure, folding, and function of the KcsA K<sup>+</sup> channel. *Biochemistry* **41**, 10771-10777
142. Schmidt, D., Jiang, Q. X., and MacKinnon, R. (2006) Phospholipids and the origin of cationic gating charges in voltage sensors. *Nature* **444**, 775-779
143. Borjesson, S. I., Hammarstrom, S., and Elinder, F. (2008) Lipoelectric modification of ion channel voltage gating by polyunsaturated fatty acids. *Biophysical journal* **95**, 2242-2253



144. Schmidt, D., Cross, S. R., and MacKinnon, R. (2009) A gating model for the archeal voltage-dependent K(+) channel KvAP in DPhPC and POPE:POPG decane lipid bilayers. *Journal of molecular biology* **390**, 902-912
145. Faure, E., Starek, G., McGuire, H., Berneche, S., and Blunck, R. (2012) A limited 4 Å radial displacement of the S4-S5 linker is sufficient for internal gate closing in Kv channels. *J Biol Chem* **287**, 40091-40098
146. Iwamoto, M., and Oiki, S. (2013) Amphipathic antenna of an inward rectifier K<sup>+</sup> channel responds to changes in the inner membrane leaflet. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 749-754
147. Martinac, B., and Hamill, O. P. (2002) Gramicidin A channels switch between stretch activation and stretch inactivation depending on bilayer thickness. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 4308-4312
148. Yuan, C., O'Connell, R. J., Feinberg-Zadek, P. L., Johnston, L. J., and Treistman, S. N. (2004) Bilayer thickness modulates the conductance of the BK channel in model membranes. *Biophysical journal* **86**, 3620-3633
149. Yuan, C., O'Connell, R. J., Jacob, R. F., Mason, R. P., and Treistman, S. N. (2007) Regulation of the gating of BKCa channel by lipid bilayer thickness. *J Biol Chem* **282**, 7276-7286
150. Perozo, E., Kloda, A., Cortes, D. M., and Martinac, B. (2002) Physical principles underlying the transduction of bilayer deformation forces during mechanosensitive channel gating. *Nature structural biology* **9**, 696-703
151. Rusinova, R., Kim, Dorothy M., Nimigean, Crina M., and Andersen, Olaf S. (2014) Regulation of Ion Channel Function by the Host Lipid Bilayer Examined by a Stopped-Flow Spectrofluorometric Assay. *Biophysical journal* **106**, 1070-1078
152. Williamson, I. M., Alvis, S. J., East, J. M., and Lee, A. G. (2002) Interactions of phospholipids with the potassium channel KcsA. *Biophysical journal* **83**, 2026-2038
153. Andersen, O. S., and Koeppe, R. E., 2nd. (2007) Bilayer thickness and membrane protein function: an energetic perspective. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **36**, 107-130
154. Fattal, D. R., and Ben-Shaul, A. (1993) A molecular model for lipid-protein interaction in membranes: the role of hydrophobic mismatch. *Biophysical journal* **65**, 1795-1809
155. Nielsen, C., Goulian, M., and Andersen, O. S. (1998) Energetics of inclusion-induced bilayer deformations. *Biophysical journal* **74**, 1966-1983

156. East, J. M., and Lee, A. G. (1982) Lipid selectivity of the calcium and magnesium ion dependent adenosinetriphosphatase, studied with fluorescence quenching by a brominated phospholipid. *Biochemistry* **21**, 4144-4151
157. Powl, A. M., Wright, J. N., East, J. M., and Lee, A. G. (2005) Identification of the hydrophobic thickness of a membrane protein using fluorescence spectroscopy: studies with the mechanosensitive channel MscL. *Biochemistry* **44**, 5713-5721
158. Killian, J. A. (1998) Hydrophobic mismatch between proteins and lipids in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* **1376**, 401-416
159. O'Keeffe, A. H., East, J. M., and Lee, A. G. (2000) Selectivity in lipid binding to the bacterial outer membrane protein OmpF. *Biophysical journal* **79**, 2066-2074
160. Cantor, R. S. (1997) The Lateral Pressure Profile in Membranes: A Physical Mechanism of General Anesthesia. *Biochemistry* **36**, 2339-2344
161. Yoo, J., and Cui, Q. (2009) Curvature generation and pressure profile modulation in membrane by lysolipids: insights from coarse-grained simulations. *Biophysical journal* **97**, 2267-2276
162. Lundbæk, J. A., Birn, P., Hansen, A. J., Søgaard, R., Nielsen, C., Girshman, J., Bruno, M. J., Tape, S. E., Egebjerg, J., Greathouse, D. V., Mattice, G. L., Koeppe, R. E., and Andersen, O. S. (2004) Regulation of Sodium Channel Function by Bilayer Elasticity: The Importance of Hydrophobic Coupling. Effects of Micelle-forming Amphiphiles and Cholesterol. *The Journal of general physiology* **123**, 599-621
163. Lundbæk, J. A., Birn, P., Tape, S. E., Toombes, G. E. S., Søgaard, R., Koeppe, R. E., Gruner, S. M., Hansen, A. J., and Andersen, O. S. (2005) Capsaicin Regulates Voltage-Dependent Sodium Channels by Altering Lipid Bilayer Elasticity. *Mol. Pharmacol.* **68**, 680-689
164. Liu, L., Zhu, W., Zhang, Z. S., Yang, T., Grant, A., Oxford, G., and Simon, S. A. (2004) Nicotine inhibits voltage-dependent sodium channels and sensitizes vanilloid receptors. *Journal of neurophysiology* **91**, 1482-1491

## Chapitre 2

### Bases théoriques

#### 2.1 Fondements de l'analyse statistique des distributions

Les troisième et quatrième chapitres présentent de nombreuses distributions statistiques relativement à l'analyse de la composition des complexes. Tel que mentionné dans le précédent chapitre, une distribution binomiale peut représenter la distribution du nombre de sous-unités marquées d'un complexe formé d'un nombre spécifique de sous-unités. Cette distribution découle directement de la probabilité qu'une sous-unité soit marquée d'une molécule fluorescente. Par exemple, si un complexe est formé de deux sous-unités identiques dont la probabilité de marquage  $p$  est inférieure à 1, chaque complexe peut être formé de  $k = 0$ , 1 ou 2 sous-unités marquées. La proportion  $P_{bin}$  de chacune de ces possibilités est obtenue par l'analyse des configurations possibles.

$$\begin{aligned}P_{bin}(k=0) &= (1-p)(1-p) = (1-p)^2 \\P_{bin}(k=1) &= p(1-p) + (1-p)p = 2p(1-p) \\P_{bin}(k=2) &= p \cdot p = p^2\end{aligned}$$

Ce principe peut être généralisé pour un nombre  $n$  de sous-unités.

$$P_{bin}(k) = \frac{n!}{k!(n-k)!} p^k (1-p)^{n-k} = \binom{n}{k} p^k (1-p)^{n-k} \quad (\text{éq. 2.1})$$

L'équation 2.1 correspond à l'expression de la distribution binomiale. Le facteur multiplicatif

$\binom{n}{k} = \frac{n!}{k!(n-k)!}$  correspond aux combinaisons possibles de l'organisation des sous-unités,

considérant que les sous-unités ne sont pas distinguables. Cette analyse statistique est

particulièrement indiquée pour les protéines intégrales de membrane, puisque le nombre de sous-unités ne varie généralement pas. Cependant, elle n'est pas nécessairement appropriée pour les toxines formeuses de pores, tel qu'illustré dans le troisième chapitre. Celles-ci sont stables en solution sous forme monomérique bien qu'elles puissent aussi s'insérer dans la membrane et former un pore multimérique (1,2). Cette particularité suggère que le regroupement de monomères puisse dépendre de la concentration, par exemple. Une distribution de Poisson pourrait dans ce cas décrire l'oligomérisation pour une concentration donnée. Cette loi de probabilité met en évidence la proportion  $P_{poiss}$  de complexes formées par le regroupement de  $k$  sous-unités par rapport à l'oligomérisation moyenne  $\lambda$ .

$$P_{poiss}(k) = \frac{\lambda^k e^{-\lambda}}{k!} \quad (\text{éq. 2.2})$$

Il est par ailleurs important de noter que la probabilité de marquage influence la distribution d'oligomères détectés alors qu'ils sont répartis selon la loi de Poisson. Une distribution binomiale est nécessairement associée à chaque ordre d'oligomérisation  $k$ , puisque les sous-unités impliquées dans la formation des complexes ne sont pas nécessairement marquées. La proportion  $P_{obs}$  de complexes dont  $k$  sous-unités sont détectées est donc obtenue à partir des équations 2.1 et 2.2, tel que

$$P_{obs}(k) = \sum_{n=k}^{\infty} \underbrace{\left[ \frac{\lambda^n e^{-\lambda}}{n!} \right]}_{\text{Poisson}} \underbrace{\left[ \frac{n!}{k!(n-k)!} p^k (1-p)^{n-k} \right]}_{\text{Binomiale}} \quad (\text{éq. 2.3})$$

Cette relation découle du fait chaque oligomère d'ordre supérieur ou égal à  $k$  peut contribuer à un nombre  $k$  de sous-unités détectées. La composante de Poisson correspond au nombre réel, alors que la composante binomiale prédit la proportion des sous-unités qui sont détectées. L'équation 2.3 peut être largement simplifiée. Elle correspond également à une distribution de Poisson, où la moyenne d'oligomérisation devient  $\lambda p$ , tel que décrit ci-dessous à l'équation 2.4.

$$\begin{aligned}
 P_{obs}(k) &= \frac{e^{-\lambda} p^k}{k!} \sum_{n=k}^{\infty} \frac{\lambda^n}{(n-k)!} (1-p)^{n-k} \\
 &= \frac{e^{-\lambda} p^k}{k!} \sum_{n=k}^{\infty} \frac{\lambda^k \lambda^{n-k}}{(n-k)!} (1-p)^{n-k} \\
 &= \frac{e^{-\lambda} (\lambda p)^k}{k!} \sum_{n=k}^{\infty} \frac{(\lambda(1-p))^{n-k}}{(n-k)!} \\
 &= \frac{e^{-\lambda} (\lambda p)^k}{k!} \left[ \sum_{x=0}^{\infty} \frac{(\lambda(1-p))^x}{x!} \right], \text{ où } x = n - k
 \end{aligned}$$

développement en série de Taylor  
de la fonction exponentielle, où  $\lambda(1-p)$   
constitue l'argument

$$= \frac{e^{-\lambda} (\lambda p)^k}{k!} e^{\lambda(1-p)}$$

$$P_{obs}(k) = \frac{(\lambda p)^k e^{-\lambda p}}{k!} \quad (\text{éq. 2.4})$$

La loi de Poisson peut être directement dérivée de la loi binomiale en considérant le cas limite où  $n \rightarrow \infty$  et  $np \rightarrow \lambda$ . Elle peut ainsi en principe constituer une bonne estimation de la loi binomiale lorsque  $n$  est grand et  $p$  est petit. Cependant, dans le contexte du décompte de sous-unités fluorescentes, la loi binomiale n'est pas utilisée pour décrire la distribution du nombre de sous-unités des complexes, contrairement à la distribution de Poisson. Alors que la distribution de Poisson attribue une valeur à tous les états d'oligomérisation (monomère, dimère, etc.), la distribution binomiale dans le contexte décrit ci-dessus n'assume qu'un seul état oligomérique, où le nombre de sous-unité marquées est distribué selon la probabilité de marquage. Il s'agit d'une distinction importante qui permet d'identifier si l'oligomérisation d'un complexe se limite à un état particulier. Le troisième chapitre utilise ces deux lois statistiques pour déterminer si la toxine formeuse de pore Cry1Aa s'assemble uniquement selon la concentration ou si un état stable du complexe existe. Un modèle de l'oligomérisation de la toxine a été élaboré à partir de ces considérations (Fig. 3.4).

Une autre considération abordée dans le prochain chapitre est celle du marquage non spécifique. En effet, il est parfois possible qu'un fluorophore puisse interagir fortement avec

un site non spécifique d'une protéine. En général, les fluorophores qui n'ont pas réagi avec le site spécifique sont retirés efficacement de l'échantillon, de sorte que le marquage non spécifique devient négligeable. La fraction de marquage non spécifique représente environ 5% pour la toxine Cry1Aa tel que calculé dans le troisième chapitre. Son effet est pris en compte afin d'expliquer précisément les distributions statistiques obtenus. Pour estimer l'impact d'un marquage non spécifique, trois états de marquage sont considérés pour chacune des sous-unités : 0, 1 ou 2 fluorophores. En définissant  $s$ , la probabilité de marquage spécifique, et  $u$ , la probabilité de marquage non spécifique, la probabilité  $p$  de chacun des trois états (0,1,2) devient :

$$\begin{aligned} p_0 &= (1-s)(1-u) \\ p_1 &= s(1-u) + (1-s)u \\ p_2 &= s \cdot u \end{aligned}$$

Ces paramètres sont utilisées afin d'analyser les configurations possibles d'un complexe. Par exemple, en assumant un complexe tétramérique, 0 à 8 fluorophores peuvent être détectés. La proportion  $P$  de chacune des possibilités est définie ci-dessous.

$$\begin{aligned} P_0 &= \frac{4!}{4!0!0!} p_0^4 p_1^0 p_2^0 \\ P_1 &= \frac{4!}{3!1!0!} p_0^3 p_1^1 p_2^0 \\ P_2 &= \frac{4!}{2!2!0!} p_0^2 p_1^2 p_2^0 + \frac{4!}{3!0!1!} p_0^3 p_1^0 p_2^1 \\ P_3 &= \frac{4!}{1!3!0!} p_0^1 p_1^3 p_2^0 + \frac{4!}{2!1!1!} p_0^2 p_1^1 p_2^1 \\ P_4 &= \frac{4!}{0!4!0!} p_0^0 p_1^4 p_2^0 + \frac{4!}{1!2!1!} p_0^1 p_1^2 p_2^1 + \frac{4!}{2!0!2!} p_0^2 p_1^0 p_2^2 \\ P_5 &= \frac{4!}{0!3!1!} p_0^0 p_1^3 p_2^1 + \frac{4!}{1!1!2!} p_0^1 p_1^1 p_2^2 \\ P_6 &= \frac{4!}{0!2!2!} p_0^0 p_1^2 p_2^2 + \frac{4!}{1!0!3!} p_0^1 p_1^0 p_2^3 \\ P_7 &= \frac{4!}{0!1!3!} p_0^0 p_1^1 p_2^3 \\ P_8 &= \frac{4!}{0!0!4!} p_0^0 p_1^0 p_2^4 \end{aligned}$$

Le même résultat peut être obtenu en combinant les deux distributions binomiales associées au marquage spécifique et non spécifique :

$$\begin{aligned}
 P_0 &= \binom{4}{0} s^0 (1-s)^4 \binom{4}{0} u^0 (1-u)^4 \\
 P_1 &= \binom{4}{1} s^1 (1-s)^3 \binom{4}{0} u^0 (1-u)^4 + \binom{4}{0} s^0 (1-s)^4 \binom{4}{1} u^1 (1-u)^3 \\
 P_2 &= \binom{4}{2} s^2 (1-s)^2 \binom{4}{0} u^0 (1-u)^4 + \binom{4}{1} s^1 (1-s)^3 \binom{4}{1} u^1 (1-u)^3 \\
 &\quad + \binom{4}{0} s^0 (1-s)^4 \binom{4}{2} u^2 (1-u)^2 \\
 &\quad \vdots \\
 P_4 &= \binom{4}{4} s^4 (1-s)^0 \binom{4}{4} u^4 (1-u)^0
 \end{aligned}$$

Finalement, un dernier aspect concernant les distributions de sous-unités marquées prend place dans le quatrième chapitre. Alors que les mesures de fluorescence à l'échelle de la molécule unique requièrent l'observation de complexes isolés, la distribution spatiale aléatoire des complexes peut parfois donner lieu à la colocalisation de complexes dans un volume inférieur à la résolution du système expérimental. C'est un problème notamment important pour les mesures de canaux exprimés à la surface de cellules mammifères. Tel qu'illustré dans le quatrième chapitre, la colocalisation de deux complexes peut excéder 20%, même en sélectionnant les cellules avec les plus faibles densités d'expression. En considérant une composition fixe, une seule distribution binomiale ne peut tenir compte de ce cas de figure. Pour analyser ce type de données, l'addition de deux distributions binomiales est nécessaire. La première établit la distribution des complexes isolés, alors que la seconde assume un complexe dont le nombre de sous-unités est doublé. Cette méthode est définie ci-dessous.

$$\begin{aligned}
 P(k) &= P_1(k) + P_2(k) \\
 P_1(k) &= A_1 \binom{n}{k} p^k (1-p)^{n-k} \text{ pour } k = 0..n \\
 P_2(k) &= A_2 \binom{2n}{k} p^k (1-p)^{2n-k} \text{ pour } k = 0..2n
 \end{aligned}$$

La contribution  $A_{1,2}$  de chacune des distributions est déterminée en minimisant l'erreur entre les distributions théoriques et expérimentales.

## 2.2 Développement de l'algorithme de PIF

Le quatrième chapitre décrit le développement d'un programme informatique permettant l'analyse automatique des mesures de photoblanchiment de complexes isolés. Celui-ci détecte les complexes fluorescents, réduit le bruit de fluorescence, détecte et compte les sauts correspondant aux événements de photoblanchiment et décide finalement si la trace est acceptable selon des critères fixes. Bien que le corps du fonctionnement et du développement de l'algorithme soit présenté dans le quatrième chapitre, certains éléments du contexte entourant la méthode ne sont pas détaillés. Cette section décrit donc sur quelles bases la méthode a été développée pour mettre en perspective les travaux du quatrième chapitre.

### 2.2.1 Filtrer le bruit de fond

L'objectif de la méthode consiste à analyser le signal de fluorescence d'un complexe marqué, alors qu'un important bruit de fluorescence s'ajoute à celui-ci. Le signal doit donc être retiré avec le moins de bruit possible pour que les événements de photoblanchiment soient identifiables. Puisque le bruit varie spatialement et temporellement, un traitement de l'acquisition considérant le bruit local doit nécessairement être appliqué.

Un traitement de données numériques qui sépare le bruit de fond du signal désiré implique l'application de filtres. Pour des données digitalisées, une approche largement utilisée consiste à utiliser des filtres dans le domaine des fréquences, tels que les filtres passe-bas, passe-haut et passe-bande (3). Les filtres passe-bas bloquent les fréquences élevées, ce qui est souvent associé à une réduction du bruit puisque les variations brusques sont atténuées. À l'inverse, un filtre passe-haut accentue ces variations. Un filtre-passe bande ne conserve qu'une bande de fréquence. Il s'agit donc d'une combinaison des deux autres types. Puisque les signaux à analyser sont souvent exprimés en fonction du temps ou de l'espace, plutôt qu'en terme de fréquences, le signal original est converti dans l'espace des fréquences en utilisant la transformée de Fourier discrète :



$$F_k = \sum_{n=0}^{N-1} f_n \cdot e^{-i2\pi kn/N} \quad (\text{éq. 2.5})$$

où  $f_n$  est la fonction digitalisée,  $k=0,1,2..N$ , et  $N$  est le nombre de données dans l'échantillon. Cette fonction est multipliée par une fonction de filtrage  $H_k$  pour préserver ou éliminer certaines fréquences. La fonction suivante illustre un exemple de filtre passe-bas :

$$H_k = \begin{cases} 1 & \text{if } k < k_0 \\ 0 & \text{if } k > k_0 \end{cases} \quad (\text{éq. 2.6})$$

Le résultat obtenu ( $G_k=F_kH_k$ ) est alors reconverti dans son espace d'origine avec la transformée inverse pour retrouver le signal modifié  $g_n$  :

$$g_n = \frac{1}{N} \sum_{k=0}^{N-1} G_k \cdot e^{i2\pi kn/N} \quad (\text{éq. 2.7})$$

Dans le contexte des mesures de fluorescence, le signal correspond à des images enregistrées à intervalle régulier. Le traitement des images peut aussi s'effectuer selon le même principe dans l'espace des fréquences. Pour une image formée de  $N \times N$  pixels, la transformée et la transformée inverse de Fourier deviennent respectivement

$$F(k,l) = \sum_{a=0}^{N-1} \sum_{b=0}^{N-1} f(a,b) e^{-i2\pi \left( \frac{ka}{N} + \frac{lb}{N} \right)} \quad (\text{éq. 2.8})$$

$$f(a,b) = \frac{1}{N^2} \sum_{k=0}^{N-1} \sum_{l=0}^{N-1} F(k,l) e^{i2\pi \left( \frac{ka}{N} + \frac{lb}{N} \right)}$$

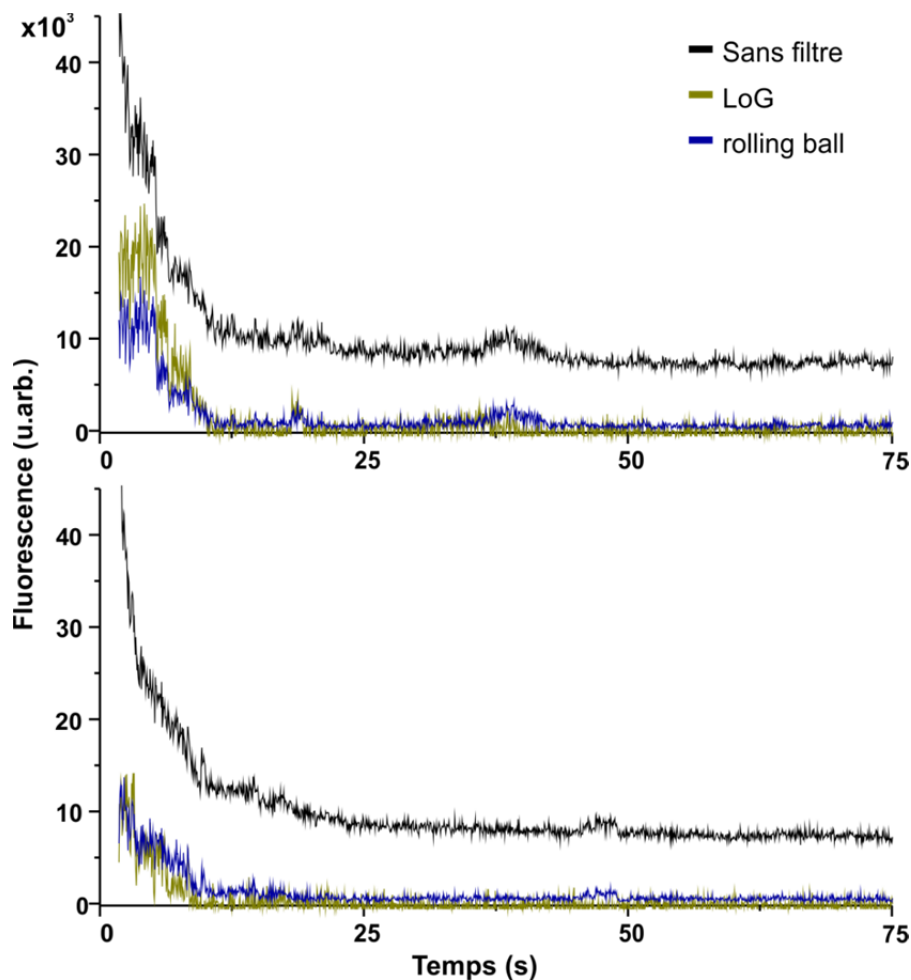
Bien que ce type de transformée demeure un outil très puissant pour mettre en évidence certaines composantes d'un signal, il est aussi possible d'y parvenir en demeurant dans l'espace d'origine. Dans le contexte des images, le concept de filtre est dans ce cas associé à celui de *kernel* (3), qui est essentiellement une matrice. Le filtrage s'effectue par la convolution de l'image et du *kernel*. Par analogie, cette opération est équivalente à une multiplication dans l'espace de Fourier. Cette procédure de filtrage par convolution est largement utilisée dans le traitement d'images, puisque plusieurs *kernels* sont décrits précisément pour des fonctions spécifiques. Pour des images composées uniquement de complexes marqués isolés, l'utilisation de *kernels* est aussi plus rapide, puisque ces derniers

sont de petite taille (généralement de 3x3 à 7x7 pixels, dépendant du système de détection). De plus, l'image entière n'a pas besoin d'être filtrée. Uniquement les complexes isolés sont traités par convolution, ce qui évite des étapes de calcul non nécessaires.

Pour retirer le bruit de fond de chaque complexe isolé, un *kernel* représentant la transformée de Laplace d'une fonction Gaussienne (*Laplacian of Gaussian* : LoG) a été utilisé. Ce *kernel* est aussi connu sous le nom de *mexican hat*, en référence à sa forme dans un graphique tridimensionnel (Fig. 4.1 B). Il permet notamment de soustraire un bruit de fond non-uniforme sur une image composée de sources ponctuelles, et donc d'extraire le signal d'intérêt. Cette approche a été particulièrement mise de l'avant en astrophysique pour détecter des sources ponctuelles, alors qu'elles se trouvent parmi un important bruit de fond (4-7). Le même principe est d'ailleurs implémenté dans le logiciel *Imaris* (Bitplane) pour soustraire le bruit de fond. La somme des éléments du *kernel* LoG est nulle. Les valeurs sont positives vers le centre du kernel, qui ressemble fortement à une fonction Gaussienne, alors que les valeurs sont négatives à son contour. Cette distribution des valeurs du *kernel* permet donc de soustraire le bruit de fond local pour chacune des sources ponctuelles.

Dans le contexte de décompte de sous-unités par mesures de fluorescence, un type de filtre basé sur l'algorithme du *rolling ball* est parfois utilisé (8-10). Cet algorithme n'est pas spécifique pour les sources ponctuelles, mais est connu pour retirer le bruit de fond non-uniforme d'images. Cette fonction est d'ailleurs incluse dans le logiciel d'imagerie *ImageJ*. Il permet de mettre en évidence des traits particuliers de l'image, selon leur taille et leur intensité. Ce qui n'est pas détecté est alors considéré comme bruit de fond et est donc soustrait de l'image (11,12). Le processus peut s'imaginer avec une boule d'une grosseur choisie qui se déplace sous le profil d'intensité de l'image pour déterminer le bruit de fond. En fixant la taille de la boule de sorte que les sources ponctuelles soient plus petites, la surface que la boule parcourt devient une estimation du bruit de fond. Cette méthode est généralement précise, mais des artéfacts peuvent apparaître si le bruit de fond varie spatialement plus rapidement que la taille de la boule. Dans ce cas, le bruit de fond calculé correspond à la moyenne autour des fluctuations du bruit de fond. Une comparaison de l'algorithme du *rolling ball* avec celui utilisé du *kernel* LoG révèle que les méthodes produisent des résultats similaires, mais que certains aspects des traces de fluorescence sont corrigés différemment

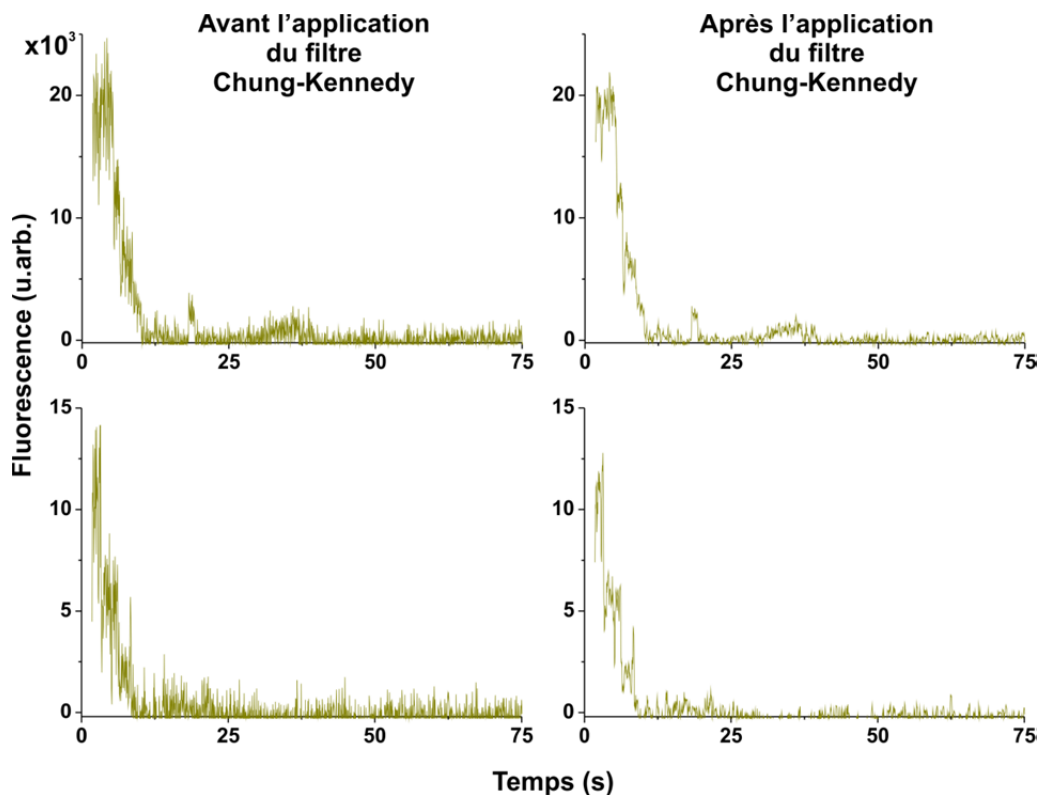
(Fig. 2.1). Aussi, la valeur absolue de l'intensité varie entre les deux méthodes puisque le bruit de fond détecté n'est pas identique.



**Figure 2.1** | Comparaison entre la méthode du *rolling ball* (bleu) et du *kernel* LoG (jaune foncé) pour retirer le bruit de fond de fluorescence de complexes membranaires marqués avec sfGFP. Les deux méthodes parviennent à soustraire le bruit qui apparaît comme une fonction exponentielle s'ajoutant à la trace non filtrée (noir). Les résultats finaux sont similaires, à quelques fluctuations près et une certaine différence d'intensité.

En addition à la soustraction du bruit de fond par le *kernel* LoG, les traces de fluorescences obtenues sont filtrées selon l'algorithme de Chung-Kennedy afin de préserver la résolution temporelle des étapes de photoblanchiment (13). Ce type filtre permet particulièrement de diminuer les fluctuations d'intensité qui apparaissent durant les « plateaux » d'un signal tout en préservant celles plus importantes qui correspondent à des

transitions d'état. Il s'agit d'une fonction importante dans l'analyse de signaux à l'échelle de la molécule unique. L'utilisation d'un filtre passe-bas n'est généralement pas aussi efficace que la méthode de Chung-Kennedy (13). Pour cette raison, cet algorithme est souvent appliqué aux traces de fluorescence à l'échelle de la molécule unique (14-18). Le fondement de cette méthode repose sur le calcul de moyennes, avant et après chacune des points formant la trace. Un poids est alors accordé à la direction (avant ou après) selon la variance calculée. Plus la variation est élevée, plus le poids est petit. Ce principe permet de conserver les étapes de photoblanchiment clairement définies, puisque les sauts de fluorescence ne participent pas significativement aux valeurs moyennes déterminées une fois les poids établis. Pour l'étude présentée au quatrième chapitre, trois points voisins sont considérés dans les deux directions pour le calcul de la valeur moyenne (fenêtre de trois).



**Figure 2.2** | Effet du filtre de Chung-Kennedy sur les traces présentées à la figure 2.1 après l'application du *kernel* LoG. Une fenêtre de trois données voisines est considérée pour le calcul de la valeur moyenne.

### 2.2.2 Détection des événements de photoblanchiment

Une fois le signal extrait du bruit par le *kernel* LoG et le filtre de Chung-Kennedy, un algorithme de détection de sauts de fluorescence est alors appliqué. Un algorithme basé sur la première dérivée de la trace a d'abord été testé afin de détecter les sauts plus importants. Ce principe a notamment été employé dans l'analyse de mesures électrophysiologiques sur un seul canal (19). Cependant, ce type d'algorithme ne permettait pas de discriminer les imperfections de la trace des événements de photoblanchiment. Le principal problème réside dans le faible signal-sur-bruit généralement obtenu, même après soustraction du bruit et filtrage des traces de fluorescence, en plus de certaines imperfections (légères fluctuations des niveaux de fluorescence) qui apparaissent fréquemment.

Plusieurs méthodes existent pour détecter les sauts discrets. Dans ce contexte, une récente étude comparative décrit la performance et précision de différents algorithmes (20). Les auteurs ont inclus un algorithme basé sur la première dérivée de la trace (*velocity threshold*), la dérivée de l'ondelette Gaussienne (*Derivative of Gaussian wavelet, dG wavelet*), le test statistique de Student (*Two sample students' t-test*) et la minimisation du  $\chi^2$  (*Chi-squared minimization method*). La méthode *velocity threshold* utilise la première dérivée pour établir la « vitesse », qui peut aussi être illustrée par l'amplitude des fluctuations. Un saut est détecté à partir d'une certaine vitesse déterminée par l'utilisateur (21). L'algorithme inclut aussi un filtrage des données par lissage de courbe afin de réduire le bruit des plateaux de fluorescence (22). La méthode de la dérivée de l'ondelette Gaussienne utilise quant à elle une fonction Gaussienne pour filtrer le bruit par convolution. La première dérivée est ensuite appliquée au signal filtré pour détecter les sauts de fluorescence. La méthode est répétée pour différentes échelles d'amplitude de la fonction Gaussienne et les résultats sont multipliés pour mettre les sauts en évidence (23). Dans le test de Student,  $N$  points voisins avant et après chacune des données de la trace forment deux échantillons distincts qui sont comparés statistiquement tel que

$$t = \frac{\overline{x_1} - \overline{x_2}}{\sqrt{\frac{s_1^2}{N} + \frac{s_2^2}{N}}} \quad (\text{éq. 2.9})$$

où  $\bar{x}_1$  et  $\bar{x}_2$  représentent les valeurs moyennes de chacun des deux échantillons alors que  $s_1^2$  et  $s_2^2$  incarnent les variances de ces mêmes échantillons. La probabilité qu'une valeur de  $t$  soit attribuée pour  $k$  degrés de liberté est calculée à partir de la densité de probabilité  $f_T(t)$

$$f_T(t) = \frac{1}{\sqrt{k\pi}} \frac{\Gamma(\frac{k+1}{2})}{\Gamma(\frac{k}{2})} \left(1 + \frac{t^2}{k}\right)^{-\frac{k+1}{2}}, \text{ où}$$

$$\Gamma(\alpha) = \int_0^{\infty} x^{\alpha-1} e^{-x} dx, \text{ et où} \quad (\text{éq. 2.10})$$

$$k = \frac{(s_1^2 + s_2^2)/N}{(s_1^4 + s_2^4)/(N(N-1))}$$

Les sauts de fluorescence sont déterminés en tant que « pics » pointant vers le haut ou vers le bas, selon qu'il s'agisse d'une diminution ou d'une augmentation de fluorescence. Finalement, le test de minimisation du  $\chi^2$  trouve des sauts de fluorescence d'une trace de  $N$  points aux positions qui minimisent la valeur calculée du  $\chi^2$  définie tel que

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^N \left( \frac{x_i - \mu_i}{\sigma} \right)^2 \quad (\text{éq. 2.11})$$

où  $x$  et  $\mu$  représentent la valeur de la trace et celle attendue (idéalisée) au point  $i$ . L'algorithme teste d'abord chaque point en considérant qu'il s'agit d'un saut de fluorescence. La valeur moyenne de part et d'autre est calculée afin d'obtenir les valeurs de  $\mu$  de cette première idéalisation. Le saut le plus important est celui où le  $\chi^2$  est minimal. L'algorithme définit ensuite la position d'autres sauts de fluorescence suivant le même principe, mais en considérant la position des sauts spécifiés précédemment pour mettre à jour les valeurs de  $\mu$ . Pour chacune de ces différentes idéalizations, qui dépendent du nombre de sauts, une contre-idéalisation est déterminée. Celle-ci est construite selon la moyenne entre des sauts non-existants, dont leur position est choisie comme celle du centre entre deux sauts obtenus par l'idéalisation. Le ratio entre la valeur du  $\chi^2$  de la contre-idéalisation et celle de l'idéalisation est alors calculé afin de choisir quelle idéalisation est la plus appropriée. La valeur maximale de ce ratio peut être généralement considérée comme une bonne approximation de la trace (20,24).

Pour chacune de ces méthodes, une diminution significative des performances se produit alors que le bruit augmente. Cependant, cette diminution apparaît significative même pour un signal-sur-bruit supérieur à 3. Ces caractéristiques sont incompatibles avec les données de fluorescence recueillies sur cellules mammifères tel que décrit au quatrième chapitre. L'algorithme le plus précis selon les auteurs de cette étude est celui du  $\chi^2$ , dont le programme associé est connu sous le nom STEPFINDER (24). Cet algorithme a été évalué dans le cadre de l'étude du quatrième chapitre (Fig. S4.1 E) à des fins de comparaison, mais n'a pas été utilisé pour l'analyse des résultats.

Mis à part ces méthodes, un algorithme exploitant les modèles de Markov cachés (*Hidden Markov Model : HMM*) pourrait techniquement servir à l'analyse des traces de fluorescence. Selon ce principe, chaque donnée formant la trace appartient à un état du modèle défini selon l'intensité et le bruit de fluorescence. Les paramètres de chacun des états du modèle et la trajectoire des transitions entre ces états sont déterminés en optimisant la probabilité que la trace observée puisse être représentée par le modèle. Des algorithmes d'optimisation tel que celui de *Baum-Welch* permettent de trouver une solution à ce problème, bien qu'elle ne corresponde pas nécessairement à la solution optimale globale. Cette utilisation des *HMMs* est largement représentée dans l'analyse de mesures électrophysiologiques en canal unitaire (25,26). Cette approche a également été adaptée à l'analyse de mesures de FRET à l'échelle de la molécule unique (27). L'algorithme correspondant a d'ailleurs été testé dans le contexte de décompte de sous-unités par mesures de photoblanchiment (28). Les auteurs de cette étude spécifient cependant que la précision du décompte obtenu avec l'algorithme n'était pas suffisante. Pour ce type de mesures, il semble que les états ne soient pas nécessairement bien identifiés. Dans le contexte des *HMMs*, des imperfections de la trace peuvent être faussement perçues comme un état. De plus, puisqu'il n'existe généralement qu'une seule transition dans chacun des états, il peut devenir difficile d'identifier un état dont le temps de résidence est court alors que le signal-sur-bruit est petit. Les données de certains états peuvent ainsi être classées dans autre état existant dont le bruit est important.

Ces considérations ont motivées la création d'un nouvel algorithme, tel que présenté au quatrième chapitre, afin de répondre correctement aux besoins de l'analyse des traces de fluorescence.

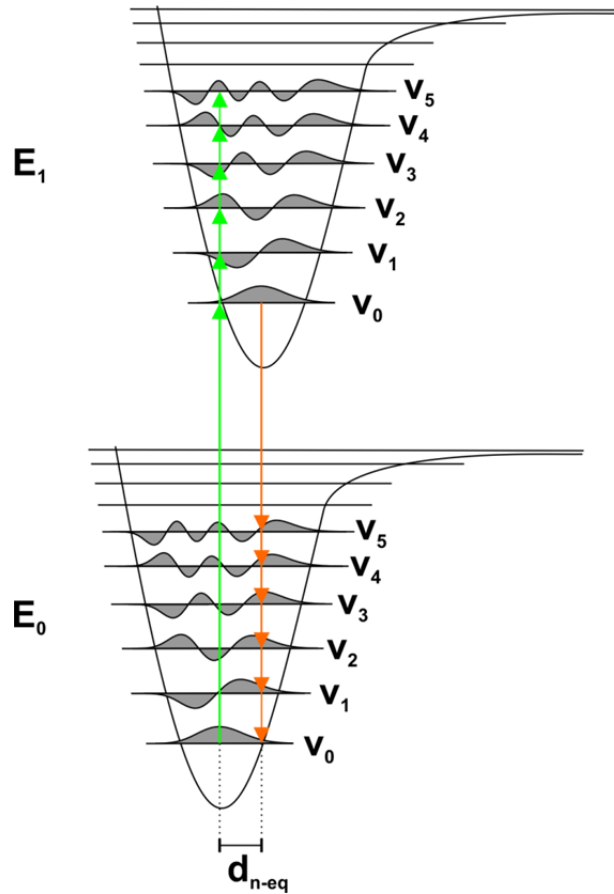
## 2.3 Bases de fluorescence

Les études du troisième, quatrième et cinquième chapitre exploitent tous les principes de fluorescence. Cette section expose donc certains aspects théoriques qui complètent les renseignements présentés dans le chapitre précédent.

Une molécule fluorescente peut être excitée par un photon incident, à condition que l'énergie de celui-ci soit compatible avec la configuration électronique de la molécule. L'énergie du photon correspond donc à une transition électronique entre l'état électronique fondamental à un état électronique excité, tel qu'illustré à la figure 1.3 B (29). Chacun des niveaux électroniques est composé de nombreux états d'énergie vibrationnelle qui correspondent aux mouvements oscillatoires de la molécule fluorescente. Alors qu'un photon excite la molécule fluorescente, la nouvelle configuration électronique peut provoquer un déplacement  $d_{n-eq}$  de la position d'équilibre des noyaux (Fig. 2.3). Selon le principe de Franck-Condon, la probabilité d'une transition à un état vibrationnel d'un niveau excité est proportionnelle au recouvrement entre les fonctions d'onde correspondantes (30). Pour illustrer ce phénomène, les fonctions d'onde des états vibrationnels  $v_x$  d'une molécule peuvent être estimées à partir du potentiel de Morse (Fig. 2.3).

Une fois un photon absorbé, le système relaxe jusqu'à l'état vibrationnel de base du premier état excité. Cette relaxation provoque un déplacement entre les spectres d'absorption et d'émission (*Stokes shift*). À partir de ce niveau excité, un photon peut alors être émis lors du retour à l'état électronique fondamental. Encore une fois, les transitions entre les états vibrationnels suivent le principe de Franck-Condon. Puisque les états vibrationnels entre le niveau électronique fondamental et celui excité sont similaires, le spectre d'émission est généralement bien représenté par une image miroir du spectre d'absorption (voir Fig. 1.3 A). Bien que ces spectres découlent de transitions électroniques discrètes, les « pics » correspondant à chacune des transitions ne sont généralement pas observés en solution. Les fluctuations de l'interaction des molécules fluorescentes avec l'environnement local modifient aléatoirement l'énergie associée à chacun des niveaux, entraînant ainsi un élargissement des pics. Ce phénomène peut être réduit en phase gazeuse, permettant ainsi une meilleure résolution des transitions (31).





**Figure 2.3** | Représentation du principe de Franck-Condon. Les transitions entre les niveaux d'énergie vibrationnels  $\nu$  de l'état électronique fondamentale ( $E_0$ ) et excité ( $E_1$ ) sont illustrées en vert et orange pour l'absorption et l'émission, respectivement.

Les photons incidents ne sont pas tous absorbés par la molécule fluorescente, tout comme les transitions électroniques entre l'état excité et l'état fondamental ne se traduisent pas tous par une émission de fluorescence. L'absorption d'une molécule fluorescente est décrite selon la loi de Beer-Lambert par son coefficient d'extinction molaire ( $\varepsilon$ ), qui est fonction de la longueur d'onde d'excitation  $\lambda_{exc}$ . Cette valeur correspond au ratio entre l'absorbance mesurée ( $A$ ) et la multiplication de la longueur du chemin optique ( $l$ ) avec la concentration molaire ( $C$ ), tel que

$$\varepsilon(\lambda_{exc}) = \frac{-\log\left(\frac{I}{I_0}\right)}{l \cdot C} = \frac{A}{l \cdot C} \quad (\text{éq. 2.12})$$

où  $I_0$  et  $I$  représente l'intensité avant et après absorption, respectivement. Ce coefficient, mesuré à la longueur d'onde où l'absorption est maximale, varie grandement d'un fluorophore à l'autre, alors qu'il se situe généralement entre  $10000 \text{ L} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$  et  $250000 \text{ L} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ .

La probabilité qu'un photon absorbé entraîne une émission de fluorescence est quant à elle décrite par l'efficacité quantique, ou le *quantum yield* ( $QY$ ) (29). Cette valeur est définie par le taux d'émission de fluorescence par rapport à la somme des taux de tous les processus qui amènent l'état électronique excité à l'état fondamental, qu'ils soient radiatifs ou non. L'expression de l'efficacité quantique est donnée par

$$QY = \frac{f}{f + k_{nr}} \quad (\text{éq. 2.13})$$

où  $f$  et  $k_{nr}$  représentent le taux d'émission de fluorescence et le taux des processus non radiatifs, respectivement. Les fluorophores généralement utilisés en microscopie possèdent une efficacité quantique allant d'environ 0.05 à presque 1.

Lorsqu'un état électronique excité relaxe jusqu'au niveau de base sans émission de photon, l'énergie est dissipée sous forme de chaleur ou transférée à une autre molécule. Dans ce dernier cas, il peut s'agir de FRET, tel que décrit dans le chapitre précédent, lorsque l'énergie est transférée à une autre molécule fluorescente. Une autre possibilité est celle du *quenching* dynamique ( $q$ ), où une molécule entre en collision avec le fluorophore, provoquant ainsi un retour à l'état fondamental sans émission de fluorescence. Les molécules d'oxygène en solution sont par exemple connues pour accomplir ce rôle efficacement (29). Contrairement au FRET qui se manifeste par des interactions dipôle-dipôle, le *quenching* dynamique se produit alors que les molécules impliquées interagissent de plus près, à la surface électronique. Ces processus non radiatifs de désexcitation réduisent l'efficacité quantique de la molécule fluorescente, et donc son intensité, tel qu'illustré par l'équation suivante :

$$QY = \frac{f}{f + k_{nr} + q + FRET} \quad (\text{éq. 2.14})$$

Il existe aussi un autre type de *quenching*, celui statique, qui est le résultat de la formation d'un complexe non fluorescent tandis que la molécule fluorescente se trouve dans

l'état électronique de base. Contrairement au phénomène de photoblanchiment, ce processus est réversible. Le photoblanchiment, tel qu'introduit au chapitre précédent, entraîne quant à lui une modification covalente alors que la molécule fluorescente est dans un état excité, et par le fait même une perte complète de fluorescence. Cette altération permanente peut être particulièrement causée par des molécules d'oxygène. Ce phénomène est utilisé dans les prochains chapitres comme technique de décompte de sous-unités fluorescentes.

## 2.4 Bibliographie

1. Parker, M. W., and Feil, S. C. (2005) Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **88**, 91-142
2. Mueller, M., Grauschopf, U., Maier, T., Glockshuber, R., and Ban, N. (2009) The structure of a cytolytic [agr]-helical toxin pore reveals its assembly mechanism. *Nature* **459**, 726-730
3. Smith, S. W. (1997) *The Scientist & Engineer's Guide to Digital Signal Processing*, First edition ed., California Technical Pub
4. Damiani, F., Maggio, A., Micela, G., and Sciortino, S. (1997) A Method Based on Wavelet Transforms for Source Detection in Photon-counting Detector Images. I. Theory and General Properties. *The Astrophysical Journal* **483**, 350
5. Cayón, L., Sanz, J. L., Barreiro, R. B., Martínez-González, E., Vielva, P., Toffolatti, L., Silk, J., Diego, J. M., and Argüeso, F. (2000) Isotropic wavelets: a powerful tool to extract point sources from cosmic microwave background maps. *Monthly Notices of the Royal Astronomical Society* **315**, 757-761
6. Vielva, P., Martínez-González, E., Cayón, L., Diego, J. M., Sanz, J. L., and Toffolatti, L. (2001) Predicted Planck extragalactic point-source catalogue. *Monthly Notices of the Royal Astronomical Society* **326**, 181-191
7. Vielva, P., Martínez-González, E., Gallegos, J. E., Toffolatti, L., and Sanz, J. L. (2003) Point source detection using the Spherical Mexican HatWavelet on simulated all-sky Planck maps. *Monthly Notices of the Royal Astronomical Society* **344**, 89-104
8. Zhang, W., Jiang, Y., Wang, Q., Ma, X., Xiao, Z., Zuo, W., Fang, X., and Chen, Y.-G. (2009) Single-molecule imaging reveals transforming growth factor- $\beta$ -induced type II receptor dimerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 15679-15683
9. Zhang, W., Yuan, J., Yang, Y., Xu, L., Wang, Q., Zuo, W., Fang, X., and Chen, Y.-G. (2010) Monomeric type I and type III transforming growth factor-[beta] receptors and their dimerization revealed by single-molecule imaging. *Cell Res* **20**, 1216-1223

10. Dietz, M., Haße, D., Ferraris, D., Göhler, A., Niemann, H., and Heilemann, M. (2013) Single-molecule photobleaching reveals increased MET receptor dimerization upon ligand binding in intact cells. *BMC Biophys* **6**, 1-9
11. Sternberg, S. R. (1983) Biomedical Image Processing. *Computer* **16**, 22-34
12. Russ, J. C. (2011) *The image processing handbook*, sixth ed., CRC Press, Boca Raton, FL
13. Chung, S. H., and Kennedy, R. A. (1991) Forward-backward non-linear filtering technique for extracting small biological signals from noise. *Journal of neuroscience methods* **40**, 71-86
14. Haran, G. (2004) Noise reduction in single-molecule fluorescence trajectories of folding proteins. *Chemical Physics* **307**, 137-145
15. Leake, M. C., Chandler, J. H., Wadhams, G. H., Bai, F., Berry, R. M., and Armitage, J. P. (2006) Stoichiometry and turnover in single, functioning membrane protein complexes. *Nature* **443**, 355-358
16. Das, S. K., Darshi, M., Cheley, S., Wallace, M. I., and Bayley, H. (2007) Membrane Protein Stoichiometry Determined from the Step-Wise Photobleaching of Dye-Labelled Subunits. *ChemBioChem* **8**, 994-999
17. Coffman, V. C., Wu, P., Parthun, M. R., and Wu, J.-Q. (2011) CENP-A exceeds microtubule attachment sites in centromere clusters of both budding and fission yeast. *The Journal of Cell Biology* **195**, 563-572
18. Lenn, T., Gkekas, C. N., Bernard, L., Engl, C., Jovanovic, G., Buck, M., and Ying, L. (2011) Measuring the stoichiometry of functional PspA complexes in living bacterial cells by single molecule photobleaching. *Chemical Communications* **47**, 400-402
19. VanDongen, A. M. (1996) A new algorithm for idealizing single ion channel data containing multiple unknown conductance levels. *Biophysical journal* **70**, 1303-1315
20. Carter, B. C., Vershinin, M., and Gross, S. P. (2008) A comparison of step-detection methods: how well can you do? *Biophysical journal* **94**, 306-319
21. Hua, W., Young, E. C., Fleming, M. L., and Gelles, J. (1997) Coupling of kinesin steps to ATP hydrolysis. *Nature* **388**, 390-393
22. Savitzky, A., and Golay, M. J. E. (1964) Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. *Analytical Chemistry* **36**, 1627-1639
23. Sadler, B. M., and Swami, A. (1999) Analysis of multiscale products for step detection and estimation. *Information Theory, IEEE Transactions on* **45**, 1043-1051

24. Kerssemakers, J. W., Munteanu, E. L., Laan, L., Noetzel, T. L., Janson, M. E., and Dogterom, M. (2006) Assembly dynamics of microtubules at molecular resolution. *Nature* **442**, 709-712
25. Qin, F., Auerbach, A., and Sachs, F. (2000) Hidden Markov modeling for single channel kinetics with filtering and correlated noise. *Biophysical journal* **79**, 1928-1944
26. Qin, F., Auerbach, A., and Sachs, F. (2000) A direct optimization approach to hidden Markov modeling for single channel kinetics. *Biophysical journal* **79**, 1915-1927
27. McKinney, S. A., Joo, C., and Ha, T. (2006) Analysis of single-molecule FRET trajectories using hidden Markov modeling. *Biophysical journal* **91**, 1941-1951
28. Simonson, P. D., Deberg, H. A., Ge, P., Alexander, J. K., Jeyifous, O., Green, W. N., and Selvin, P. R. (2010) Counting bungarotoxin binding sites of nicotinic acetylcholine receptors in mammalian cells with high signal/noise ratios. *Biophysical journal* **99**, L81-83
29. Lakowicz, J. R. (2006) *Principles of fluorescence spectroscopy*, Third ed., Springer Science+Business Media, LLC, New York, NY, U.S.A.
30. Turro, N. J., Scaiano, J. C., and Ramamurthy, V. (2010) *Modern Molecular Photochemistry of Organic Molecules*, First ed., University Science Books
31. (2009) *Reviews in Fluorescence 2007*, Springer



## Chapitre 3

# Single molecule fluorescence study of the Bacillus thuringiensis toxin Cry1Aa reveals tetramerization

Nicolas Groulx<sup>a,c,1,2</sup>, Hugo McGuire<sup>a,c,1,2</sup>, Raynald Laprade<sup>a,c</sup>, Jean-Louis Schwartz<sup>a,b,d</sup> and Rikard Blunck<sup>a,c,d,3</sup>

<sup>a</sup>Groupe d'Étude des Protéines Membranaires (GÉPROM), <sup>b</sup>Centre SÈVE, Departments of <sup>c</sup>Physics and <sup>d</sup>Physiology, Université de Montréal, Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada

Received for publication August 22, 2011, and in revised form October 14, 2011

Published online October 17, 2011

*The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 286, No. 49, pp. 42274–42282, December 9, 2011

Reproduced by permission of the *American Society for Biochemistry and Molecular Biology*

**Keywords:** single subunit counting; pore-forming toxins; Bt toxin; single molecule fluorescence; supported bilayer

---

The work was supported in part by Natural Sciences and Engineering Research Council Grants 327201DG (to R. B.) and 171373DG (to J.-L. S. and R. L.), Canada Research Chair Grant 202965 and Canadian Foundation for Innovation Grant 202965 (to R. B.) and the Groupe d'Étude des Protéines Membranaires (GÉPROM). Work performed at GÉPROM and Center SÈVE was supported by FRSQ and FQRNT, respectively.

<sup>1</sup> Both authors contributed equally to this work

<sup>2</sup> Recipient of a Fonds de Recherche du Québec-Nature et Technologies fellowship.

<sup>3</sup> To whom correspondence should be addressed: Dépt. de Physique, C.P. 6128 Succ. Centre-ville, Université de Montréal, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada.

## **Contribution des auteurs**

Pour cette étude, Nicolas Groulx a purifié et marqué d'un fluorophore les différents mutants de la toxine Cry1Aa. Il a également participé à la prise de mesures en m'assistant. Il a aussi fait l'analyse des traces de fluorescence pour obtenir les distributions du nombre de sous-unités fluorescentes. Il a ensuite participé à l'analyse des distributions et au processus d'écriture (première version). Il a finalement contribué au design de la recherche en suggérant l'expérience de décompte des sous-unités de la toxine Cry1Aa.

J'ai préparé les échantillons et reconstitué la toxine dans des vésicules à différentes concentrations. Je me suis aussi occupé du montage pour m'assurer que les mesures étaient de bonne qualité. J'ai ensuite effectué la prise de mesures et construit un programme informatique pour assister et accélérer l'analyse des résultats. Ce programme (optimisé au chapitre 3) détecte les toxines marquées, identifie les complexes isolés et enregistre la trace de fluorescence associée sous forme d'image. Ce processus réduit la tâche d'analyse au décompte manuel des sauts de fluorescence sur chacune des traces (N.G.). J'ai également contribué à l'analyse et au design de la recherche.

Raynald Laprade et Jean-Louis Schwartz ont fourni l'ADN des différents mutants de la toxine et ont prodigué de judicieux conseils pour la purification de la toxine et son utilisation pour nos expériences.

Rikard Blunck a contribué à l'analyse et au design de la recherche tout au long des expériences et a particulièrement contribué à l'élaboration du modèle cinétique d'oligomérisation. Il a également contribué à l'écriture de l'article en éditant la première version écrite par Nicolas Groulx et moi.



### 3.1 Capsule

**Background:** The stoichiometry of pore-forming toxins is frequently unknown because crystal structures do not reflect the active conformations.

**Results:** We used single subunit counting on fluorescently-labeled Cry1Aa toxins of *B. thuringiensis* to follow its oligomerization process.

**Conclusion:** We determined that the final architecture of the pores is tetrameric.

**Significance:** The stochastic analysis introduced permits to apply single subunit counting to dynamic processes such as oligomerization.

### 3.2 Summary

Pore forming toxins constitute a class of potent virulence factors that attack their host membrane in a 2- or 3-step mechanism. After binding to the membrane often aided by specific receptors, they form pores in the membrane which either unfolds a cytolytic activity in itself or provides a pathway to introduce enzymes into the cells that act upon intracellular proteins. The elucidation of the pore forming mechanism of many of these toxins represents a major research challenge. As the toxins often refold after entering the membrane, their structure in the membrane is unknown, and key questions such as the stoichiometry of individual pores and their mechanism of oligomerization remain unanswered. In this study, we used single subunit counting based on fluorescence spectroscopy in order to explore the oligomerization process of the Cry1Aa toxin of *Bacillus thuringiensis*. Purified Cry1Aa toxin molecules labeled at different positions in the pore forming domain were inserted into supported lipid bilayer and the photobleaching steps of single fluorophores in the fluorescence time traces were counted to determine the number of subunits of each oligomer. We found that toxin oligomerization is a highly dynamic process that occurs in the membrane and that tetramers represent the final form of the toxins in a lipid bilayer environment.

### 3.3 Introduction

Pore forming toxins (PFT) are endogenous and potentially harmful proteins synthesized in a wide variety of bacteria, plants and animals (1). Their specificity for certain hosts permits the use of PFTs as biopesticides or in medical treatment. So are several toxins

produced by *Bacillus thuringiensis* (Bt) a widely used biological alternative to chemical pesticides due to their specificity for certain insects of various orders, their low remanence in the environment, the absence of effects on mammals and humans, and the slow onset of resistance in target organisms (for review see 2). Like other Bt toxins, Cry1Aa, which is toxic only to *Lepidoptera* insects, is ingested by the larvae as a protoxin and activated by proteases in the midgut of the larvae (3). The activated toxin is thought to then bind variably to different types of gut epithelial surface proteins (reviewed in 4). Subsequently, it will intercalate in the membrane, where it refolds to form pores responsible for cell destruction (2,5-8). The crystal structure of Cry1Aa presents three functional domains (Fig. 3.1 A) (9). Domains II and III are involved in receptor binding and structural integrity (2,4,10,11), whereas domain I, consisting of seven  $\alpha$ -helices, is responsible for pore formation (8,12,13).

Previous studies have shown that helix  $\alpha 4$  of domain I lines the pores formed by Cry1Aa in planar lipid bilayers (14) and in brush border membrane vesicles from *Manduca sexta* larva epithelial gut cells (15,16). Yet, little information is available on the final architecture of the functional pores, i.e., whether they are monomeric or oligomeric, and, in the latter case, how many subunits make up the pores and whether oligomerization takes place before or after membrane insertion.

Several studies have approached the question of Bt toxin oligomerization in solution and in receptor-free artificial membranes. In solution, Bt toxin oligomers or aggregates of a large range of sizes have been observed (17-19). In receptor-free bilayers, a number of different Bt toxins formed ion channels with principal conductances of several hundreds of pS, but smaller conducting levels down to a few pS were also observed, indicative of the presence of conducting substates, smaller size channels of a lower order of oligomerization, or both (7,9,20-25). In brush-border membrane vesicles, Cry1Aa forms pores with a diameter of 24-26 Å (26). A similar diameter of 20-26 Å was obtained in the case of Cry1C in receptor free bilayers as used in the current study (25). It was proposed that these channels formed clusters of various sizes that gated cooperatively, resulting in multiple conductance states. On the other hand, trimers of Cry4Ba toxin, but also monomers and dimers, were detected in liposomes according to SDS page analysis (27).

We recently studied the pore forming mechanism of Cry1Aa using fluorescence spectroscopy (8) and found in our system that the pore-forming mechanism includes the insertion of the hairpin consisting of the  $\alpha$ -helices  $\alpha 3$ - $\alpha 4$  into the membrane from the inner to the outer leaflet, while the rest of domain I remained on the inner leaflet. This intercalation of the hairpin preceded pore formation suggesting an intermediate step, which might be lateral diffusion and oligomerization. Direct visual demonstration of pore-like structures of Bt toxins in lipid membranes was provided by atomic force microscopy (AFM) (28-30) and electron microscopy (31). AFM measurements visualized a depression of diameter  $\sim 15$  Å surrounded by four elements, each of which had a diameter of  $\sim 14$  Å corresponding to the size of single  $\alpha$ -helices or hairpin loops. The observed structures were, thus, consistent with a tetrameric stoichiometry as proposed earlier (14,32). According to our proposed model (8) mainly the  $\alpha 3$ - $\alpha 4$  loop protrude from the external membrane leaflet which would explain the size of the structures. Nevertheless, each Cry1Aa toxin contains seven  $\alpha$ -helices and consequently five loops in the pore-forming domain I, rendering it impossible to predict how many toxin molecules contribute to each pore forming unit without additional information. Furthermore, the same toxin is suggested to form trimeric complexes in 2-dimensional membrane associated toxin crystals, as revealed by electron microscopy (31).

In the present work, we set out to determine the number of subunits that comprise the Cry1Aa oligomers using a single-molecule fluorescence approach based on photobleaching step analysis (33-37). Since single fluorophores photobleach in a step-like behavior, the number of photobleaching steps occurring in a single labeled protein is equivalent to the number of fluorophores attached to it. In our case, each toxin monomer was labeled with a single fluorophore. Therefore, the number of photobleaching steps indicated how many subunits were present in individual Cry1Aa oligomers. Our results show that Cry1Aa forms tetramers in artificial membranes and suggest that oligomerization takes place after insertion into the lipid bilayer.

## 3.4 Experimental procedures

### 3.4.1 Purification, labeling and reconstitution of Cry1Aa into lipid vesicles

Cry1Aa constructs in plasmid vectors pMP39 and pBA1 were described earlier (8,38). In order to monitor the fluorescence emission from fluorescently labeled Cry1Aa subunits using thiol-reactive fluorophores, cysteines were introduced into domain I by site-directed mutagenesis at positions F50 and P121 in the loop located between helices  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  and helices  $\alpha 3$  and  $\alpha 4$ , respectively. Mutations were inserted using Quikchange (Stratagene) and amplified using Qiagen Miniprep Kits (Qiagen) following standard protocols. Constructs were sequenced in order to verify mutations.

Both mutants were transformed into *Bt* strain Cry HD-73. The bacteria were grown 72 hrs in YT media at 37°C containing 100  $\mu\text{g/ml}$  ampicillin. Protoxins were solubilized, trypsin activated and toxins purified by fast protein liquid chromatography as described previously (38). Purity was verified by SDS gel electrophoresis. All mutants were labeled with 10-fold excess of tetramethylrhodamine-5-maleimide (TMRM) (Invitrogen) for 60 minutes. Unbound dye was removed by buffer exchange using concentrators (30 kDa, Amicon, Millipore). The labeling ratio was determined by comparing the protein concentration (Bradford assay, Pierce) with the fluorophore concentration (absorption). The average labeling ratio after washing was  $0.76 \pm 0.02$ . Cry1Aa-WT had low unspecific labeling ( $0.06 \pm 0.03$ ; see *Results*). Unilamellar vesicles at 2.5 mg/ml lipid concentration were formed from POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) and POPE (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine) at (1:1) mass ratio or from DPhPC (1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; all Avanti Polar Lipids) in the experiment buffer using the same method as described previously (35). All mutants were finally reconstituted in unilamellar vesicles at concentrations of 0.17  $\mu\text{g/ml}$  to 2.33  $\mu\text{g/ml}$  diluted from a stock solution of 33  $\mu\text{g/ml}$  in experiment buffer (100 mM KCl, 10 mM Hepes, 1 mM  $\text{CaCl}_2$  at pH 7). Preparations were sonicated and vortexed briefly to allow proper mixing and, finally, incubated overnight at 4°C prior to measurements.

### 3.4.2 *Fluorescence Measurements of Toxins in Supported Bilayer*

Borosilicate glass coverslips were washed by 30' sonication in different solvents in the order: Alconox (Fischer Scientific), acetone and anhydrous ethanol. Between each step, the coverslips were rinsed with H<sub>2</sub>O (MilliQ, filtered at 0.2 μm). Coverslips were stored in H<sub>2</sub>O and dried under a steady N<sub>2</sub> stream immediately before use. At the recording intensities below 1.5 mW, almost no background fluorescence was detected from the top of the coverslip. 5 μl of mutant/vesicle mixture was added to 400 μl of experiment buffer on a clean coverslip. After 45 min, the vesicles formed supported bilayers on the coverslip, and excess vesicles were carefully washed off with experiment buffer using a micropipette.

Fluorescence was measured using an inverted microscope (Axiovert 200, Zeiss). A 30 mW, 532-nm laser (World Star Tech) was selected as the excitation source. Excitation light (<1.5 mW) was defocused to a diameter of ≈ 10 mm. Emission was collected with a 63× N.A. 1.4 objective (Zeiss) and filtered by a 610/75 nm emission filter in combination with a Z532 dichroic mirror (Chroma Technologies). Images were recorded with an EMCCD Camera (iXon<sup>+</sup> 860BV, Andor Technology) (Fig. 3.1 B). In order to ensure complete photobleaching of the spots, each fluorescence recording was acquired until the image has reached a stable emission level (background) (~5').

### 3.4.3 *Photobleaching Data Analysis*

Images were analyzed using a Matlab (Mathworks) routine written in-house. The intensity of a single pixel spot was plotted over time and further analyzed whether it met the selection criteria: only spots that showed clear photobleaching steps were considered to ensure that only single oligomers were observed (see below). We observed occasionally modulation of fluorescence intensity which might have caused by blinking or movement of the protein/fluorophore. Although these traces were included in the analysis of the number of photobleaching steps, the fluorescence modulation itself was not further analyzed as we were interested only in the stoichiometry of the pore.

For every analyzed trace, we determined the number of photobleaching steps since they correspond to the number of labeled subunits forming a toxin oligomer (33,35). Subunit counting statistics were first fitted to a Poisson distribution.

$$P(k) = e^{-\lambda} \frac{\lambda^k}{k!} \quad (\text{eq. 3.1})$$

where  $P(k)$  represents the Poisson distribution probability as a function of  $k$ , the number of photobleaching steps, and  $\lambda$  denotes the average of  $k$ . The Poisson distribution provides information on the average number of subunits within stochastically distributed oligomers.

The binomial distribution, on the other hand, is suitable only if the oligomerization results in a specific number of subunits:

$$P(k) = \binom{n}{k} \cdot p^k q^{n-k} \quad (\text{eq. 3.2})$$

where  $P(k)$  represents the binomial distribution probability as a function of  $k$ , the number of photobleaching steps,  $n$  is the number of subunits expected,  $p$  represents the probability of detecting an existing subunit and  $q = (1-p)$  the probability of not detecting it (photobleached or not labeled). Fitting was done by least squares optimization.

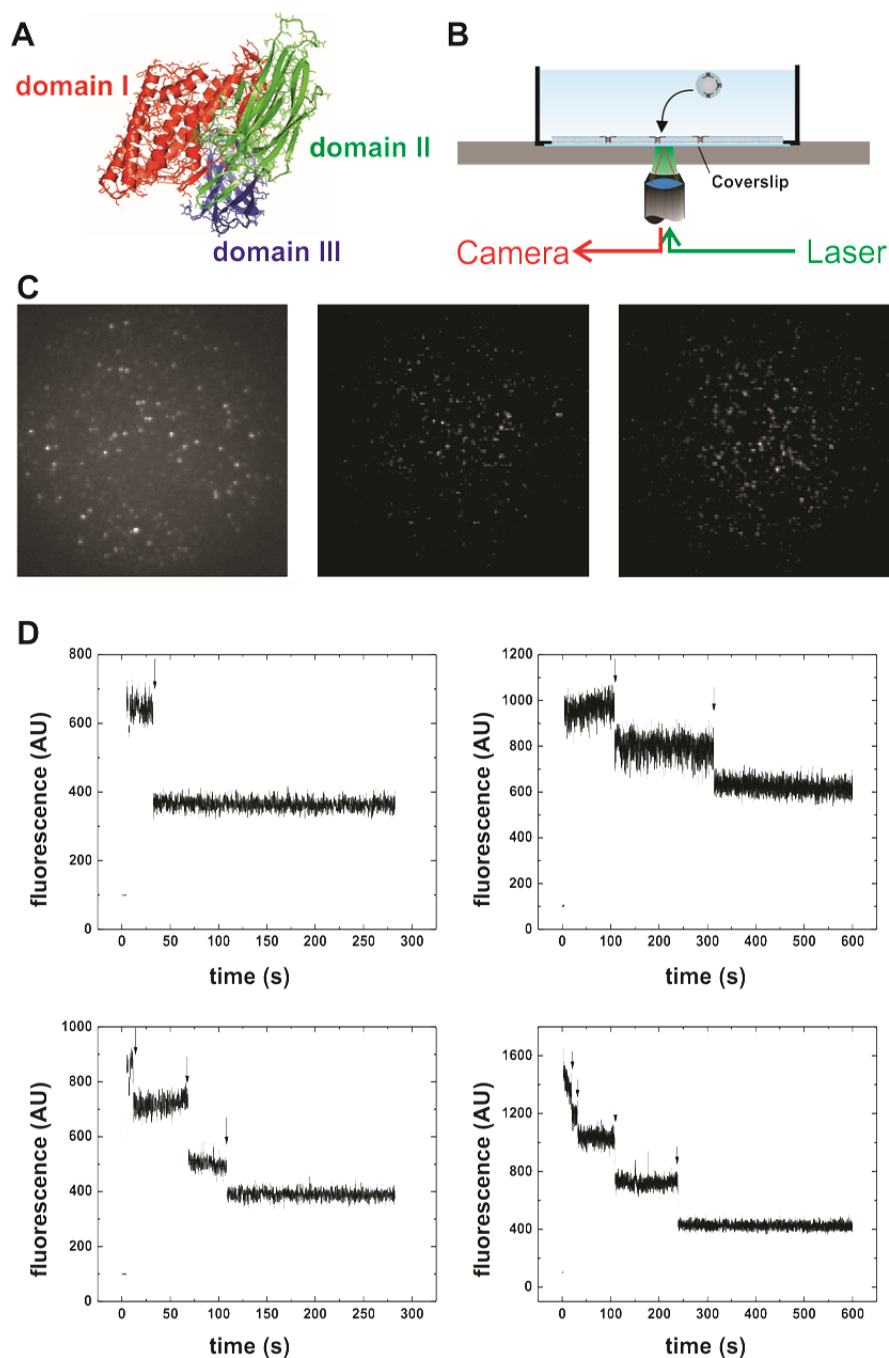
## 3.5 Results

### 3.5.1 *The toxin oligomerizes as a tetramer*

Our aim was to establish whether we can deduce from the observed distribution of photobleaching steps the stoichiometry – if any – of the Cry1Aa pores. To this end, the toxins were fluorescently labeled using thiol-reactive chemistry and supported bilayers were formed on the surface of glass coverslips from liposomes containing the labeled Cry1Aa toxins in variable concentrations between 0.17 and 2.33  $\mu\text{g/ml}$ . Within this concentration range (1.95 – 2.6  $\mu\text{g/ml}$ ), pore formation has been observed in receptor-free planar lipid bilayer (8). In the presence of receptors, this concentration reduced to 0.2  $\mu\text{g/ml}$  to 1.1  $\mu\text{g/ml}$  (32). When directly injected into the midgut of insect larvae, the  $\text{LC}_{50}$  was approximately 7  $\mu\text{g/ml}$  (39). Distinct fluorescent spots were observed in the supported bilayer. The measurement of the

efficiency of labeling  $EOL = 0.76 \pm 0.02$  (i.e. the number of fluorophores per monomer; see EXPERIMENTAL PROCEDURES) established that not more than one fluorophore was attached to each monomer, meaning that each photobleaching event corresponds to a single subunit (monomer, Fig. 3.1 D). However, the number of bleaching steps is only the minimal number of subunits found in each oligomer as not every subunit is observed via fluorescence due to incomplete labeling or previous photobleaching.

We found previously that the labeled Cry1Aa toxins form pores in planar lipid bilayers like the wildtype toxin (8). Fluorescence from TMRM-labeled Cry1Aa toxins was observed from the supported bilayer using epifluorescence and was found to display fluorescence intensity in distinct spots distributed over the entire field of view ( $49 \mu\text{m} \times 49 \mu\text{m}$ ; Fig. 3.1 C). Experiments were performed with Cry1Aa mutants F50C and P121C using two different lipid compositions: POPE:POPC (1:1) and DPhPC in order to verify whether the observed oligomerization distribution is specific to either the labeling position in the pore forming domain or to the lipid composition (fluidity). We analyzed the photobleaching behavior of the single spots. Most spots displayed a step-like photobleaching behavior, which confirmed that each spot contained only a few fluorophores (Fig. 3.1 D). The exceptions were a few spots which fluoresced very intensely and followed an exponential bleaching behavior. These spots were likely caused by aggregated toxins or other impurities in the sample and were, thus, excluded from further analysis. We also excluded spots, which were not fully bleached after the entire bleaching period (5 min.) or where toxins moved during the exposure time as well as when the baseline did not remain constant. In those cases, the number of bleaching steps could not be confidently determined.



**Figure 3.1** | Single toxin detection using fluorescence. (A) Domains of Bt toxin Cry1Aa according to crystal structure (23). (B) Setup for photobleaching experiments with supported bilayers: a 532nm laser excites fluorophores present in supported bilayers formed on a glass coverslip. A high numerical aperture objective collects the emitted light and directs it to an EMCCD camera. (C) Dispersion of fluorescent spots at incubation concentrations 0.17  $\mu\text{g/ml}$  (*left*), 1.21  $\mu\text{g/ml}$  (*center*) and 2.33  $\mu\text{g/ml}$  (*right*). (D) For each spot the fluorescence intensity time trace was determined. They showed discrete photobleaching steps (*arrows*), and the number of steps was counted to determine the minimal number of subunits per oligomer.

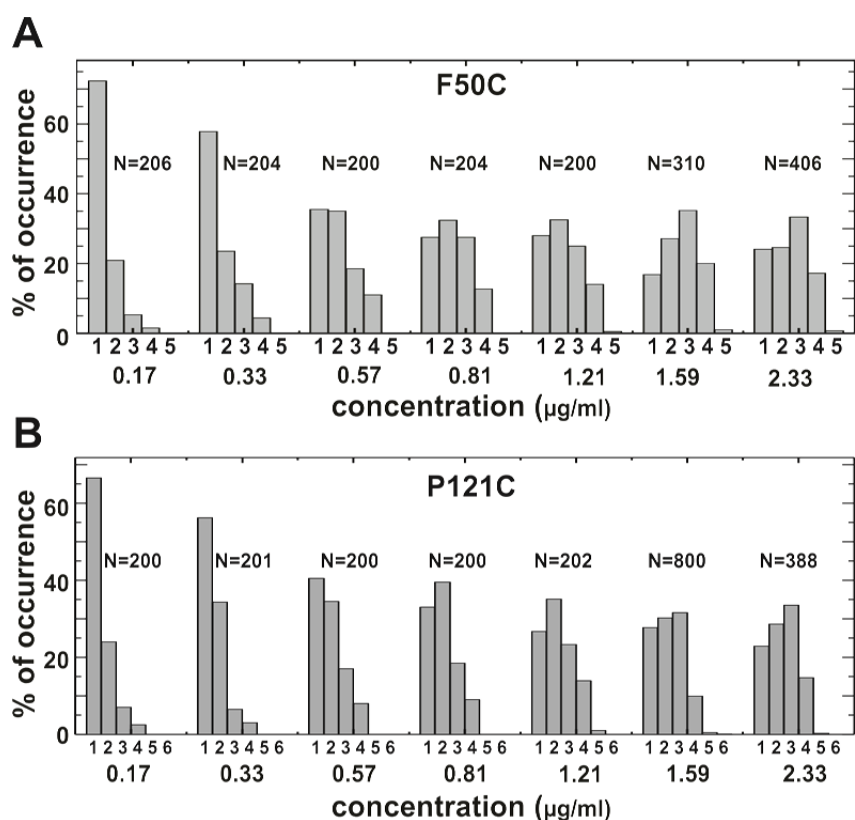


The observed spots were specific to the labeled toxins. Background measurements in the absence of toxins showed low number of spots ( $14 \pm 2$ ). In presence of labeled wild-type Cry1Aa, which contains no endogenous cysteines, we found  $110 \pm 16$  spots, which was  $\sim 5.5$  times lower than the number observed in the presence of labeled mutants. This ratio was consistent with the level of unspecific labeling (1/13) resulting in a ratio in the range of 6.3 and 2.6 if the proteins contain 2 and 6 subunits, respectively. Although the unspecific labeling only slightly influences the histograms (the probability of finding 2 non-specifically attached fluorophores in one oligomer is  $< 0.6\%$ ), we will consider its influence below.

We determined the number of bleaching steps for each fluorescent spot from reconstituted toxin preparations at increasing concentrations between 0.17 and 2.33  $\mu\text{g/ml}$  and analyzed the histograms representing the number of bleaching steps found under the different conditions. At even higher concentrations ( $>2.33 \mu\text{g/ml}$ ), the spot density was close to the spatial resolution limit such that the spots were no longer distinct from one another. The photobleaching step size was not always equidistant, and a certain variability was observed also within one oligomer. This effect has been described earlier (40-42). The fluorescence intensity is influenced by a number of parameters including environmental properties, relative orientation and homotransfer efficiency. The Cry toxin is a dynamic protein suggesting that the fluorophores may dwell in more than one physical state. The type of distribution found in the histograms will give us information about the oligomerization. A randomly composed oligomer would follow a Poisson distribution, while an oligomer with a defined stoichiometry would rather display a binomial distribution. We, therefore, fitted the histograms of bleaching steps to both a Poisson distribution (eq.1; see PHOTBLEACHING DATA ANALYSIS) – by minimizing the difference between the data and the fit as a function of the average ( $\lambda$ ) – and to binomial distributions for different number of subunits  $n$  (dimer, trimer, tetramer etc., eq.2). For the binomial distributions, an additional fit parameter  $p$  was introduced, representing the probability of observing an existing subunit with fluorescence. While it is related to the efficiency of labeling (EOL), its value remains slightly lower because photobleaching prior to the measurement occurred to a certain extent.

At the lowest concentration (0.17  $\mu\text{g/ml}$ ), both toxin mutants photobleached to the greatest part in a single step ( $67.5 \pm 3.3\%$ ) in both lipid compositions (Fig. 3.2 A,B & Suppl.

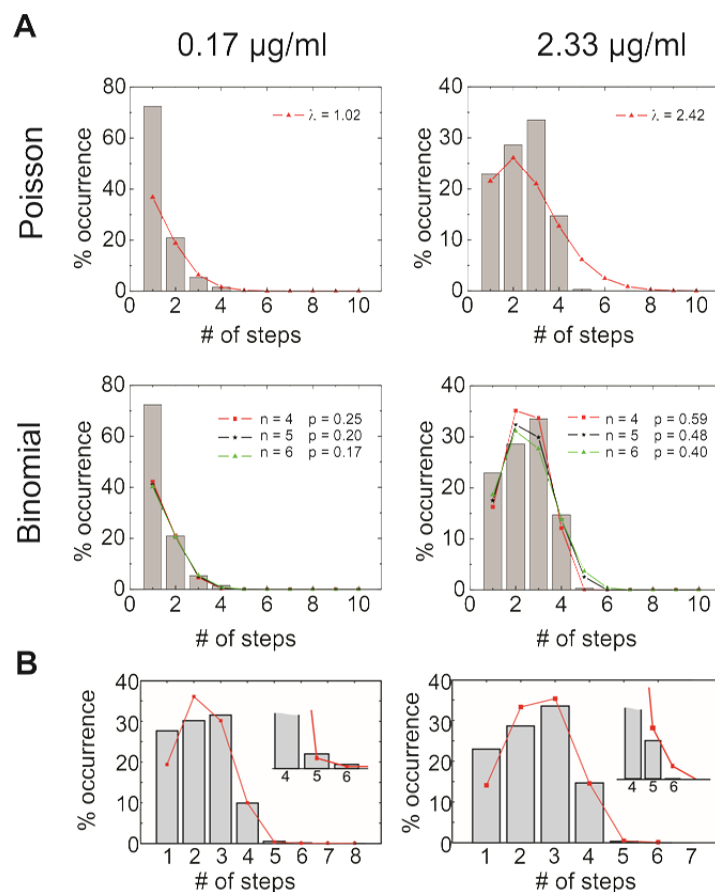
Fig. S3.1 A,B) with a lower occurrence of dimers, trimers and tetramers (in average  $24.2 \pm 2.4\%$ ,  $6.6 \pm 0.8\%$ , and  $1.8 \pm 0.7\%$ , respectively). These results show that only minimal variations were observed between the different mutants and lipid environments. We found this to be consistent in all our measurements. A Poisson distribution with  $\lambda = 1.07 \pm 0.04$  was the best fit to our results. Even though a binomial distribution with the number of subunits  $n = 4, 5$  and  $6$  also fits the distribution, the associated probability  $p$  would have to be too low in each case ( $<0.26$ ; see suppl. Table S3.1 for all results). As this is significantly lower than the EOL, a random number of subunits – as described by the Poisson distribution – seems to be the most likely interpretation.



**Figure 3.2** | Experimental distributions of photobleaching steps. Distribution of (A) F50C and (B) P121C bleaching steps in DPhPC vesicles containing variable toxin concentrations incubated overnight. The numbers under the columns indicate the number of steps observed, N marks the number of spots analyzed for each concentration.

With increasing concentration of toxin in the bilayer, a shift in the distribution can be observed with both toxin mutants F50C and P121C and independent of the lipid composition

(Fig. 3.2 A,B & Suppl. Fig. S3.1 A,B). Towards the highest concentration used here, the number of monomers observed decreased and the distribution shifted steadily towards an increased number of tri- and tetramers and a low number of pentamers. Interestingly, a steep drop occurred between tetramers and pentamers and only twice hexamers were observed among a total of 9129 spots that were analyzed.



**Figure 3.3** | Binomial and Poisson Distributions. (A) Distribution of F50C oligomers in DPhPC vesicles at 0.17 µg/ml (left) and 2.33 µg/ml (right) of toxin incubated overnight fitted with a Poisson distribution (top) and a binomial distribution with  $n = 4, 5$  and  $6$  (bottom). (B) Distributions of P121C in DPhPC at concentrations 1.59 µg/ml (left) and 2.33 µg/ml (right) fitted with a double binomial distribution taking specific and unspecific labeling into account. The  $p$  values were 0.55 and 0.61, respectively, and the probability for unspecific labeling 0.01.

It appeared that the type of distribution observed with increasing concentration was shifting from a Poisson type to a binomial one (Fig. 3.3 A). At low concentration ( $< 0.81$  µg/ml), the optimized  $p$  values for a binomial distribution of the number of labeled

subunits per oligomer was still lower than  $0.38 \pm 0.03$ . This value was significantly different than the EOL value, meaning that there was no defined stoichiometry at low toxin concentrations, and up to concentrations of  $0.81 \mu\text{g/ml}$  the distribution was most appropriately described by a Poisson distribution. In contrast, the histograms were best fitted by a binomial distribution at higher concentrations, at which the distributions significantly deviated from Poisson distributions (Fig. 3.3 A). This suggested that the toxins now assume a defined stoichiometry.

The high number of four photobleaching steps that we found in the histograms excludes a di- and trimeric stoichiometry. Intuitively, one would presume a tetrameric pore-forming entity, however, as we still find a low number of five subunits, tetra-, penta- or hexameric ( $n = 4, 5$  and  $6$ ) structures would be possible models. Fitting the distributions to binomial distributions resulted in values of  $p$ , the probability of a subunit being detected, significantly lower than the EOL ( $p < 0.5$ ) for  $n = 5$  and  $6$ . This and the steep drop from four to five observed steps would argue against oligomers with more than four subunits.

To obtain a more objective measure whether the pore-forming entity is indeed tetrameric, we determined the statistical probability to obtain the experimentally observed number of pentamers assuming a pentameric distribution ( $n = 5$ ). We did this by considering the values to be Poisson-distributed around the theoretically predicted value for a binomial distribution with  $n = 5$  for the highest two concentrations  $1.59$  and  $2.33 \mu\text{g/ml}$  for all four experimental conditions (see suppl. Information). The probability  $p$  was either optimized by a binomial fit with  $n = 5$  to all the distribution or calculated directly from the frequency of 4 bleaching steps. In both cases, the probability that the experimentally observed frequency of 5 steps originated from a pentameric binomial distribution with  $p$  was below 1%. Moreover, in each of the eight conditions ( $1.6$  and  $2.3 \mu\text{g/ml}$  for both lipid compositions and mutants), the observed value was consistently at the lower end of the Poisson distribution and not spread evenly over the entire spectrum, as would be expected if they were stochastically distributed. We can thus conclude with a 99% certainty that the toxins form tetramers.

If the pore-forming entity of the toxins is tetrameric, the low number of 5 and 6 bleaching steps observed still remained to be explained (Fig. 3.2 A,B). Theoretically two explanations are possible assuming a tetrameric distribution: (i) there was more than one

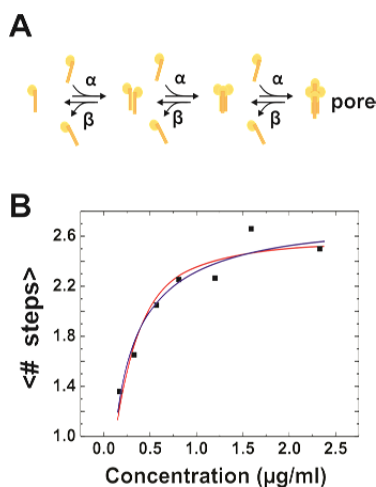
tetramer present in the spots; and (ii) some tetramers contained more than four fluorophores. The first possibility, we can directly rule out again. With more than 50% of all spots showing 3 or 4 fluorophores, the probability of not finding any spots that contain 7 or 8 bleaching steps would be negligible. The second possibility, on the other hand, is consistent with the unspecific labeling rate for wildtype toxin. The ratio of specific to non-specific labeling was 0.76/0.06, meaning that approximately every 13<sup>th</sup> monomer had an extra fluorophore attached non-specifically. We fitted, therefore, the distributions obtained at concentrations 1.6 and 2.3  $\mu\text{g/ml}$  to a double binomial fit (Fig. 3.3 B), where each monomer has a probability  $p$  and a different probability  $u$  of being labeled specifically and non-specifically, respectively. The distributions fitted the experimental data very well with  $p = 0.64 \pm 0.04$  and  $u = 0.04 \pm 0.03$ . The low number of 5 and 6 photobleaching steps are thus explained by non-specific labeling to some of the monomers, and the observed histograms are consistent with a tetrameric pore-forming entity of Cry1Aa.

### 3.5.2 Concentration dependent evolution of Cry1Aa oligomerization

The shift of the distribution from a Poisson to a binomial distribution with increasing concentration of the toxin in the bilayer suggests that the stoichiometry is dependent on the toxin *availability*. While at high concentrations a tetrameric structure forms, at lower concentrations a more arbitrary stoichiometry exists. This raises the question as to which oligomerization state of the toxin intercalates into the membrane. It had, for instance, been suggested that – in the presence of receptors – a tetrameric pre-pore forms in solution, which then is inserted as such into the membrane (43), whereas other authors proposed that the monomers enter the membrane first (2,44). To further investigate the evolution of the stoichiometry, we analyzed the development of the distribution as a function of toxin concentration.

Figure 3.4B shows the average number of bleaching steps  $\langle n \rangle$ , i.e. the population mean, found for increasing toxin concentrations in the incubation solution. As the distribution, and thus  $\langle n \rangle$ , varies with increasing concentrations, the oligomer composition in the membrane must also be different. If at lower concentrations the stoichiometry remained unchanged, identical distributions with lower absolute number of spots should have been

observed. On the other hand, if the oligomerization were random, we would expect Poisson distributions for all concentrations and a linear dependence of  $\langle n \rangle$  on the concentration. Thus, in contrast to our results, no saturation should be observed.



**Figure 3.4** | Theoretical model. (A) Kinetic model explaining the stepwise oligomerization process of the toxin. The forward rate is concentration dependent. (B) Fit of the population mean values of the number of bleaching steps fitted with the model in (A) (*blue*) and dependent on the vesicle/toxin ratio (*red*).

The *availability* of the toxins is given by two parameters; first by the concentration of the toxin in the solution, and second, by the ratio of toxins per unilamellar vesicle. Let us first consider the concentration of the toxin. The oligomerization of the Cry1Aa tetramer can be described by a kinetic model, where the association constant equals  $K_a = \alpha/\beta [\text{Cry1Aa}]$ , where  $\alpha [\text{Cry1Aa}]$  is the association rate,  $\beta$  the dissociation rate and  $[\text{Cry1Aa}]$  the concentration of Cry1Aa in solution (Fig. 3.4 A). In such a model, the number of oligomers consisting of  $n$  subunits is given by  $A_n = K_a^{n-1} A_1$  (see suppl. information).

From this distribution, we can calculate the expected value  $\langle n \rangle$  for the average number of bleaching steps (monomers; Fig. 3.4 B; *blue curve*).  $\langle n \rangle$  saturates at a value of 2.6 corresponding to a tetramer with a labeling probability of 0.65. This value corresponds well to the EOL of 0.76 for the cysteine mutants if we also consider a certain bleaching probability. We found an association constant  $K_a = 3.34 \text{ s}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ .

On the other hand, in order to obtain a sufficiently low number of toxins to be able to perform the subunit counting experiments, it was necessary to decrease the toxin concentration to a concentration that the number of toxin monomers and vesicles in the solution became comparable. We estimated the ratio between toxin monomers and vesicles (toxin/vesicle) assuming vesicle radii varying from 25 nm (small unilamellar vesicles (SUVs)) to ~500 nm (large unilamellar vesicles (LUVs)). In all cases, the ratio toxin/vesicle was close to or smaller than one at the low concentrations. For a typical radius of 200 nm, the ratio was 1.4. However, we can be certain that availability of the monomers was not the limiting factor at the higher concentrations used considering that the ratio increased to 18.9 at a toxin concentration of 2.33  $\mu\text{g/ml}$ . In a random distribution of toxins onto the available vesicles, tetramers may only form in those vesicles which contain at least four toxin molecules. However, if for instance five molecules were present in a specific vesicle, a tetramer may be formed, but a single monomer will remain. These “overhang” molecules will significantly influence the oligomerization and will also lead to a concentration dependence of  $\langle n \rangle$ . We fitted the observed evolution of  $\langle n \rangle$  assuming a Poisson distribution of the available toxins onto the vesicles with an average vesicle radius of  $r = 252.5$  nm, a labeling probability of  $p = 0.69$  assuming full tetramer formation ( $K_a \gg 1$ ; Fig. 3.4 B, *red curve*). The curve fits the data well indicating that also the distribution of monomers onto vesicles may explain the concentration dependence, in which case  $K_a$  does not need to be concentration dependent.

As both possibilities, a concentration dependent  $K_a$  and the vesicle/toxin ratio, would explain the evolution of  $\langle n \rangle$ , we cannot deduce whether oligomerization process itself is concentration dependent. However, the curve obtained in figure 3.4B indicates that not only tetramers are present in the bilayer but several oligomerization states coexist (monomers, dimers, trimers and tetramers). Formation of a pre-pore is thus not a prerequisite to membrane insertion but also monomers effectively enter the membrane. The maximal oligomerization state remains the tetramer, but we cannot exclude the possibility that the coexisting lower oligomers also form functional pores.

The coexistence of different oligomers would explain the significant difference between the  $p$  value of the tetramer binomial fit and the EOL. If several oligomerization states coexist, the observed distribution will be a sum of binomial distributions (one for each

oligomerization state). At high concentration, even if we are very close to the expected tetrameric binomial distribution, other states may still exist and, thus, shift the distribution at some extent to smaller probabilities  $p$ .

### 3.6 Discussion

This study is the first direct demonstration of oligomerization, up to the tetrameric level, of Cry1A toxins. We used fluorescence spectroscopy based on the step-wise photobleaching principle in order to count the number of subunits present in Cry1Aa toxin pores within a supported bilayer free of toxin receptors. The data suggest that the pore is composed of 4 subunits (Fig. 3.2). Based on the spatial separation of the single spots, we can exclude the possibility that many spots are formed of two arbitrarily superposing oligomers. The results were not significantly affected by the lipid composition (POPE:POPC versus DPhPC) or by the position of labeling (F50C versus P121C). They also showed that several oligomerization states coexist in the bilayer. Figures 3.2 and 3.4 confirm that the oligomerization saturates with four subunits, indicating that in the concentration range observed here the tetrameric structure is the final state suggesting it to be the pore-forming unit. We cannot with certainty decide whether monomer, dimer and trimer also form pores. The measurements were, nevertheless, limited by the highest concentration that can be used and still obtain a spatial separation between the toxin oligomers.

Whether the final structure is a symmetric tetramer or a dimer of dimers with a double pore cannot be distinguished with the present method. However, single pore electrophysiological recordings and the symmetric images obtained in AFM measurements (28) argue against the possibility of dimers of dimers.

The existence of Bt toxin oligomers in receptor-free artificial membranes (planar lipid bilayers and liposomes) has been proposed for several Bt toxins, mainly as a result of the observation of subconducting states in planar lipid bilayer experiments (7,9,20,21,24,25,45) and liposome permeabilization assays (27,46,47). Furthermore, a tetrameric configuration was suggested, based on the biophysical properties of the pores (14,45). First direct evidence for a tetrameric pore came from atomic force microscopy measurements in supported lipid bilayers (28-30). In the AFM measurements, however, it was impossible to determine how many toxin



molecules were involved in forming the four identical observed structures. In contrast, Cry4Ba toxin were observed by electron crystallography to form trimers in 2D crystals (31) and a tetrameric arrangement of trimers was obtained by computational simulation of intermolecular interactions in sixteen Bt toxin homologous sequence (48). In this study, we were able to directly show the tetrameric nature of the Cry1Aa-pores because each toxin monomer contained a single fluorophore such that the number of fluorescent steps recorded corresponded to the number of toxin molecules that formed an individual pore.

Studies on cell and membrane vesicle permeabilization (26,49-52), AFM measurements (28) and planar lipid bilayer data (25) provided an estimate of Bt toxin pore diameter ranging between 15 and 26 Å. The pores' maximum conductance in 150 mM KCl is 250-450 pS (7,8,21). These observations are consistent with a tetrameric structure for Bt pores when comparing them with potassium channels, whose tetrameric pore is also comprised of 8  $\alpha$ -helices. Their central pore sizes up to 12 Å in diameter away from the 2-4 Å-wide selectivity filter and shows conductances up to 250 pS in physiological conditions (53).

Whether the process of Bt toxin oligomerization occurs before membrane insertion or takes place within the membrane, was still unresolved. Data on toxin aggregation or oligomerization in solution, i.e., before it partitions into the membrane, is scarce and variable ranging from monomers to oligomers with 8 to 10 subunits (17-19,54). It was suggested that the toxin assembles into stable oligomer barrels (pre-pores) before inserting into the bilayer (43) but also that monomers insert into the bilayer first and, subsequently, diffuse laterally in the membrane to associate into multimers to form pores (46,55,56). In the present study, we established that the oligomerization process may be described by a kinetic model as shown in figure 3.4A. Nevertheless, we could not distinguish whether the oligomerization occurs in the membrane or in solution before insertion since both possibilities are consistent with our data. However, the concentration-dependent distributions, observed here, make evident that the toxins can enter the membrane in their monomeric state because a large number of monomers were observed at low concentrations. Thus, we showed that oligomeric pre-pore formation is not a necessary step in the mode of action of Bt toxins, as suggested previously (44,56).

We favor the possibility that the oligomerization process occurs within the membrane since the structure of the toxin changes after intercalation into the membrane (8,57-59). Our

previous study showed that pore formation occurred after the insertion of the toxin into the bilayer and with a temporal delay between the observed necessary conformational change and pore formation (8). The delay would be consistent with a lateral diffusion of the monomers in order to assemble to tetramers and would argue against the monomer being able to form pores itself. Also in AFM studies, a time-dependent increase of the size of the observed structures was described resulting in a final size of 350 Å for the entire complex (29).

Numerous studies have attempted to assess the role of toxin receptors in oligomerization, either before insertion into the membrane, in terms of pre-pore formation, or within the membrane, in terms of pore formation by toxin monomers (reviewed in 6). While in our system no receptors were present, the fact that the pores have identical properties whether they were mediated by receptors or intercalated into the membrane autonomously suggests that a similar pore architecture prevails.

In conclusion, we found – using single subunit counting – that Cry1Aa of *B. thuringiensis* enter the membrane in monomeric form and that it assembles to tetrameric pores in the lipid bilayer. The single subunit counting technique utilized for the analysis was different from previous studies where membrane proteins with a fixed stoichiometry were investigated (33-37). The highly dynamic nature of the oligomerization process and presence of a mixture of oligomeric states required the employment of advanced stochastic analysis of histograms and a high number of spots had to be analyzed in order to statistically distinguish between different models. We expect that studying oligomerization using single molecule fluorescence will help understand this highly dynamic protein-protein interaction for a number of similar proteins.

### **3.7 Acknowledgements**

We would like to thank Marc Juteau and Mireille Marsolais for technical assistance, Luke Masson for providing the Cry1Aa-pMP39, -pBA1 and some of the cysteine mutants and Georges A. Haddad for comments on the manuscript.

### 3.8 Supplemental information

#### 3.8.1 Derivation of oligomer distribution

According to the model in figure 3.4A, an oligomer consisting of  $n$  monomers is given by

$$A_n = (K_a)^{n-1} A_1 = \left(\frac{\alpha'}{\beta}\right)^{n-1} A_1 \quad (\text{eq. S3.1})$$

with  $\alpha' = \alpha$  [Cry1Aa]. The above statement is equivalent to the equation

$$A_n = K_a A_{n-1} = \frac{\alpha'}{\beta} A_{n-1}$$

This can be shown for  $A_2$  from the differential equation describing the temporal evolution of  $A_1$ :

$$\frac{d}{dt} A_1 = -\alpha' A_1 + \beta A_2$$

and in equilibrium

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} A_1 &= 0 \\ \Rightarrow A_2 &= \frac{\alpha'}{\beta} A_1 \end{aligned}$$

We will show that this is true for  $A_{n+1}$  under the assumption that it is true for  $A_n$ .

$$\frac{d}{dt} A_n = \alpha' A_{n-1} - (\alpha' + \beta) A_n + \beta A_{n+1}$$

with

$$A_{n-1} = \frac{\beta}{\alpha'} A_n$$

follows

$$\frac{d}{dt} A_n = \beta A_n - (\alpha' + \beta) A_n + \beta A_{n+1}$$

which should equal zero in equilibrium, thus

$$A_{n+1} = \frac{\alpha'}{\beta} A_n$$

As it is true for  $A_2$ , it is thus iteratively true for all  $A_n$ .

### 3.8.2 Calculation of the probability to observe $x$ pentamers in an ensemble of $N$ measurements

The probability  $p$  for the binomial distribution with  $n = 5$  is determined by fitting the histogram directly or by calculation from the number of tetramers as this would be least contaminated by lower order oligomers. For both  $p$ , the number of expected pentamers  $\langle x \rangle$  was calculated using  $\langle x \rangle = N p^5$ , where  $N$  is the number of total spots analyzed (the number of invisible spots with no label is negligible for the higher concentrations).

The probability  $prob(x)$  to observe exactly  $x$  pentamers in an ensemble of  $N$  measurements assuming a pentameric stoichiometry with labeling probability  $p$  is:

$$prob(x) = \frac{\langle x \rangle^x}{x!} \exp(-\langle x \rangle) = \frac{(Np^5)^x}{x!} \exp(-Np^5) \quad (\text{eq. S3.2})$$

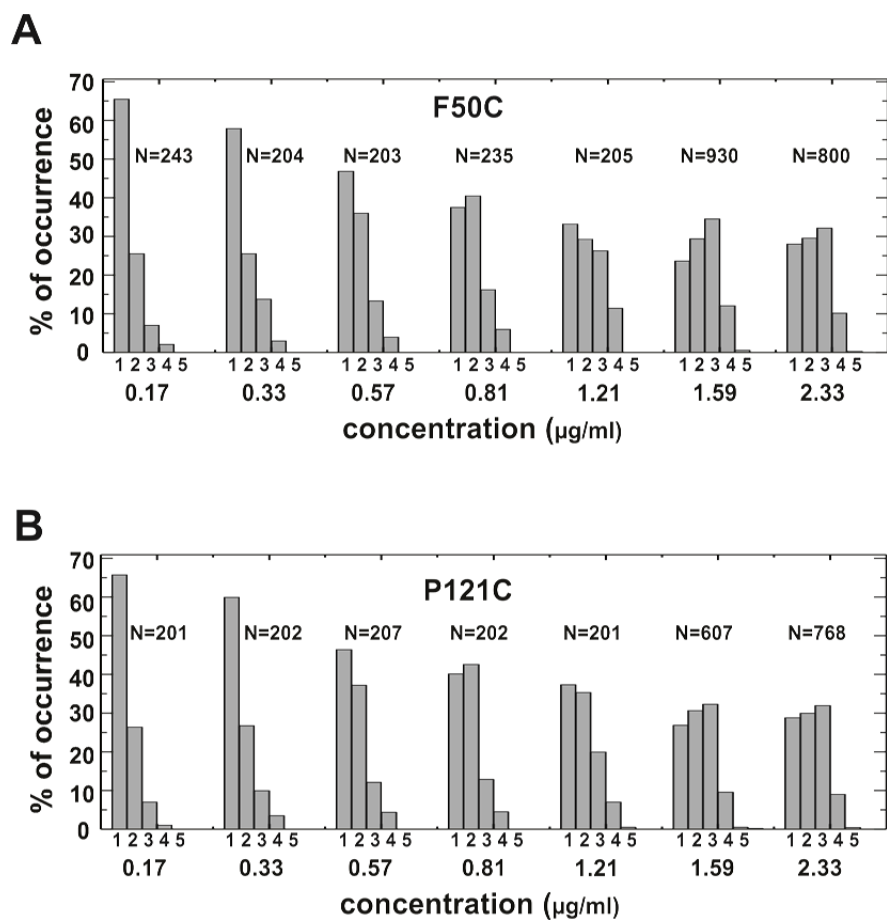
### 3.8.3 Summary of the results

<b>P121C</b>											
			occurrence (%)								
lipids	Concentration (µg/ml)	N	1	2	3	4	5	6	P4	P5	$\lambda$
DPhPC	0.17	200	66.50	24.00	7.00	2.50	0.00	0.00	0.26	0.21	1.07
DPhPC	0.33	201	56.22	34.33	6.47	2.99	0.00	0.00	0.31	0.25	1.23
DPhPC	0.57	200	40.50	34.50	17.00	8.00	0.00	0.00	0.39	0.32	1.61
DPhPC	0.81	200	33.00	39.50	18.50	9.00	0.00	0.00	0.44	0.36	1.84
DPhPC	1.21	202	26.73	35.15	23.27	13.86	0.99	0.00	0.50	0.41	2.15
DPhPC	1.59	800	27.70	30.19	31.55	9.94	0.50	0.12	0.53	0.43	2.19
DPhPC	2.33	388	22.94	28.61	33.51	14.69	0.26	0.00	0.59	0.48	2.42
POPC-POPE	0.17	201	65.67	26.37	6.97	1.00	0.00	0.00	0.27	0.22	1.10
POPC-POPE	0.33	202	59.90	26.73	9.90	3.47	0.00	0.00	0.28	0.23	1.16
POPC-POPE	0.57	207	46.38	37.20	12.08	4.35	0.00	0.00	0.35	0.28	1.43
POPC-POPE	0.81	202	40.10	42.57	12.87	4.46	0.00	0.00	0.39	0.32	1.58
POPC-POPE	1.21	201	37.31	35.32	19.90	6.97	0.50	0.00	0.42	0.34	1.72
POPC-POPE	1.59	607	26.85	30.64	32.29	9.56	0.49	0.16	0.54	0.44	2.21
POPC-POPE	2.33	768	28.78	29.95	31.90	8.98	0.39	0.00	0.53	0.43	2.15
<b>F50C</b>											
DPhPC	0.17	206	72.33	20.87	5.34	1.46	0.00	0.00	0.25	0.20	1.02

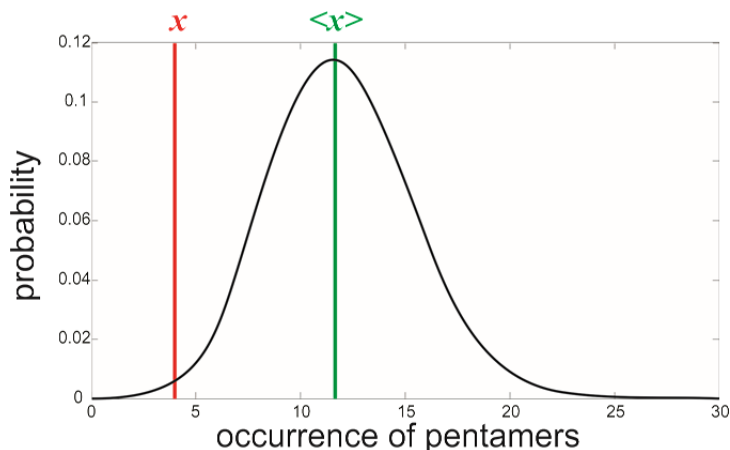
DPhPC	0.33	204	<b>57.84</b>	<b>23.53</b>	<b>14.22</b>	<b>4.41</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	0.28	0.23	1.18
DPhPC	0.57	200	<b>35.50</b>	<b>35.00</b>	<b>18.50</b>	<b>11.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	0.42	0.35	1.79
DPhPC	0.81	204	<b>27.45</b>	<b>32.35</b>	<b>27.45</b>	<b>12.75</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	0.52	0.42	2.17
DPhPC	1.21	200	<b>28.00</b>	<b>32.50</b>	<b>25.00</b>	<b>14.00</b>	<b>0.50</b>	<b>0.00</b>	0.51	0.42	2.14
DPhPC	1.59	310	<b>16.77</b>	<b>27.10</b>	<b>35.16</b>	<b>20.00</b>	<b>0.97</b>	<b>0.00</b>	0.65	0.53	2.70
DPhPC	2.33	406	<b>24.14</b>	<b>24.63</b>	<b>33.25</b>	<b>17.24</b>	<b>0.74</b>	<b>0.00</b>	0.60	0.49	2.48
POPC-POPE	0.17	243	<b>65.43</b>	<b>25.51</b>	<b>7.00</b>	<b>2.06</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	0.27	0.22	1.09
POPC-POPE	0.33	204	<b>57.84</b>	<b>25.49</b>	<b>13.73</b>	<b>2.94</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	0.29	0.23	1.19
POPC-POPE	0.57	203	<b>46.80</b>	<b>35.96</b>	<b>13.30</b>	<b>3.94</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	0.35	0.28	1.43
POPC-POPE	0.81	235	<b>37.45</b>	<b>40.43</b>	<b>16.17</b>	<b>5.96</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	0.41	0.33	1.68
POPC-POPE	1.21	205	<b>33.17</b>	<b>29.21</b>	<b>26.24</b>	<b>11.39</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	0.47	0.39	1.98
POPC-POPE	1.59	930	<b>23.59</b>	<b>29.35</b>	<b>34.47</b>	<b>12.06</b>	<b>0.53</b>	<b>0.00</b>	0.58	0.47	2.37
POPC-POPE	2.33	800	<b>28.00</b>	<b>29.50</b>	<b>32.13</b>	<b>10.13</b>	<b>0.25</b>	<b>0.00</b>	0.53	0.43	2.19

**Supplemental Table S3.1** | Summary of the results. Table showing the summary of the distributions for F50C and P121C for both lipid compositions. N gives the number of experiments, P4 and P5 the probabilities p for a binomial distribution with  $n = 4$  and  $5$ , respectively.  $\lambda$  is the fit parameter for Poisson distributions to each condition.

3.8.4 Supplemental figures



**Supplemental Figure S3.1** | Experimental distributions in POPE-POPC. Distribution of (A) F50C and (A) P121C bleaching steps in POPE-POPC vesicles containing variable toxin concentrations incubated overnight. The numbers under the columns indicate the number of steps observed, N marks the number of spots analyzed for each concentration.



**Supplemental Figure S3.2** | Poisson Probability Density Function.  $\langle x \rangle$  depicts the value for the occurrence of pentamers, which is theoretically to be expected according to a binomial fit to the observed data.  $x$  is the experimentally observed number of pentamers. The curve gives the probability to observe  $x$  pentamers. For all experimental conditions,  $x$  was found in the lower tail of the Poisson distribution.

### 3.9 References

1. Alouf, J. and Freer, J. (2006) The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins, third Ed., academic press, San Diego
2. Schnepf, E., Crickmore, N., Van, R. J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. R., and Dean, D. H. (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 775-806
3. Hofte, H. and Whiteley, H. R. (1989) Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53, 242-255
4. Pigott, C. R. and Ellar, D. J. (2007) Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71, 255-281
5. Knowles, B. H. (1994) Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal d-endotoxin. *Adv. Insect Physiol.* 24, 275-308
6. Bravo, A., Likitvivanavong, S., Gill, S. S., and Soberon, M. (2011) *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 41, 423-431
7. Peyronnet, O., Vachon, V., Schwartz, J. L., and Laprade, R. (2001) Ion channels induced in planar lipid bilayers by the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Aa in the presence of gypsy moth (*Lymantria dispar*) brush border membrane. *J. Membr. Biol.* 184, 45-54
8. Groulx, N., Juteau, M., and Blunck, R. (2010) Rapid topology probing using fluorescence spectroscopy in planar lipid bilayer: the pore-forming mechanism of the toxin Cry1Aa of *Bacillus thuringiensis*. *J. Gen. Physiol.* 136, 497-513

9. Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Pusztai-Carey, M., Schwartz, J. L., Brousseau, R., and Cygler, M. (1995) *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J. Mol. Biol.* 254, 447-464
10. Aronson, A. I., Wu, D., and Zhang, C. (1995) Mutagenesis of specificity and toxicity regions of a *Bacillus thuringiensis* protoxin gene. *J. Bacteriol.* 177, 4059-4065
11. Lee, M. K., Young, B. A., and Dean, D. H. (1995) Domain III exchanges of *Bacillus thuringiensis* CryIA toxins affect binding to different gypsy moth midgut receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216, 306-312
12. Walters, F. S., Slatin, S. L., Kulesza, C. A., and English, L. H. (1993) Ion channel activity of N-terminal fragments from CryIA(c) delta-endotoxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196, 921-926
13. Schwartz, J. L. and Laprade, R. (2000) Membrane permeabilisation by *Bacillus thuringiensis* toxins: protein insertion and pore formation. In J.-F. Charles et al., editor. *Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application*, 2000 Kluwer Academic Publishers, Netherlands
14. Masson, L., Tabashnik, B. E., Liu, Y. B., Brousseau, R., and Schwartz, J. L. (1999) Helix 4 of the *Bacillus thuringiensis* CryIAa toxin lines the lumen of the ion channel. *J. Biol. Chem.* 274, 31996-32000
15. Girard, F., Vachon, V., Lebel, G., Prefontaine, G., Schwartz, J. L., Masson, L., and Laprade, R. (2009) Chemical modification of *Bacillus thuringiensis* CryIAa toxin single-cysteine mutants reveals the importance of domain I structural elements in the mechanism of pore formation. *Biochim. Biophys. Acta* 1788, 575-580
16. Girard, F., Vachon, V., Prefontaine, G., Marceau, L., Schwartz, J. L., Masson, L., and Laprade, R. (2009) Helix alpha 4 of the *Bacillus thuringiensis* CryIAa toxin plays a critical role in the postbinding steps of pore formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 359-365
17. Walters, F. S., Kulesza, C. A., Phillips, A. T., and English, L. H. (1994) A stable oligomer of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin, CryIIIA. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 24, 963-968
18. Guereca, L. and Bravo, A. (1999) The oligomeric state of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins in solution. *Biochim. Biophys. Acta* 1429, 342-350
19. Masson, L., Mazza, A., Sangadala, S., Adang, M. J., and Brousseau, R. (2002) Polydispersity of *Bacillus thuringiensis* CryI toxins in solution and its effect on receptor binding kinetics. *Biochim. Biophys. Acta* 1594, 266-275
20. Slatin, S. L., Abrams, C. K., and English, L. (1990) Delta-endotoxins form cation-selective channels in planar lipid bilayers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 169, 765-772
21. Schwartz, J. L., Garneau, L., Savaria, D., Masson, L., Brousseau, R., and Rousseau, E. (1993) Lepidopteran-specific crystal toxins from *Bacillus thuringiensis* form



- cation- and anion-selective channels in planar lipid bilayers. *J. Membr. Biol.* 132, 53-62
22. English, L., Robbins, H. L., Von Tersch, M. A., Kulesza, C. A., Ave, D., Coyle, D., Jany, C. S., and Slatin, S. L. (1994) Mode of action of CryIIA: a *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 24, 1025-1035
  23. Lorence, A., Darszon, A., Diaz, C., Lievano, A., Quintero, R., and Bravo, A. (1995) Delta-endotoxins induce cation channels in *Spodoptera frugiperda* brush border membranes in suspension and in planar lipid bilayers. *FEBS Lett.* 360, 217-222
  24. Smedley, D. P., Armstrong, G., and Ellar, D. J. (1997) Channel activity caused by a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin preparation depends on the method of activation. *Mol. Membr. Biol.* 14, 13-18
  25. Peyronnet, O., Nieman, B., Genereux, F., Vachon, V., Laprade, R., and Schwartz, J. L. (2002) Estimation of the radius of the pores formed by the *Bacillus thuringiensis* Cry1C delta-endotoxin in planar lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* 1567, 113-122
  26. Carroll, J. and Ellar, D. J. (1997) Analysis of the large aqueous pores produced by a *Bacillus thuringiensis* protein insecticide in *Manduca sexta* midgut-brush-border-membrane vesicles. *Eur. J. Biochem.* 245, 797-804
  27. Likitvivatanavong, S., Katzenmeier, G., and Angsuthanasombat, C. (2006) Asn183 in alpha5 is essential for oligomerisation and toxicity of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin. *Arch. Biochem. Biophys.* 445, 46-55
  28. Vie, V., Van, M. N., Pomarede, P., Dance, C., Schwartz, J. L., Laprade, R., Frutos, R., Rang, C., Masson, L., Heitz, F., and Le, G. C. (2001) Lipid-induced pore formation of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa insecticidal toxin. *J. Membr. Biol.* 180, 195-203
  29. Laflamme, E., Badia, A., Lafleur, M., Schwartz, J. L., and Laprade, R. (2008) Atomic force microscopy imaging of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins interacting with insect midgut apical membranes. *J. Membr. Biol.* 222, 127-139
  30. Puntheeranurak, T., Stroh, C., Zhu, R., Angsuthanasombat, C., and Hinterdorfer, P. (2005) Structure and distribution of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin in lipid membranes. *Ultramicroscopy* 105, 115-124
  31. Ounjai, P., Unger, V. M., Sigworth, F. J., and Angsuthanasombat, C. (2007) Two conformational states of the membrane-associated *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba delta-endotoxin complex revealed by electron crystallography: implications for toxin-pore formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 361, 890-895
  32. Schwartz, J. L., Lu, Y. J., Sohnlein, P., Brousseau, R., Laprade, R., Masson, L., and Adang, M. J. (1997) Ion channels formed in planar lipid bilayers by *Bacillus thuringiensis* toxins in the presence of *Manduca sexta* midgut receptors. *FEBS Lett.* 412, 270-276

33. Ulbrich, M. H. and Isacoff, E. Y. (2007) Subunit counting in membrane-bound proteins. *Nat. Methods* 4, 319-321
34. Das, S. K., Darshi, M., Cheley, S., Wallace, M. I., and Bayley, H. (2007) Membrane protein stoichiometry determined from the step-wise photobleaching of dye-labelled subunits. *Chembiochem.* 8, 994-999
35. Blunck, R., McGuire, H., Hyde, H. C., and Bezanilla, F. (2008) Fluorescence detection of the movement of single KcsA subunits reveals cooperativity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 20263-20268
36. Tombola, F., Ulbrich, M. H., and Isacoff, E. Y. (2008) The voltage-gated proton channel Hv1 has two pores, each controlled by one voltage sensor. *Neuron* 58, 546-556
37. Simonson, P. D., Deberg, H. A., Ge, P., Alexander, J. K., Jeyifous, O., Green, W. N., and Selvin, P. R. (2010) Counting bungarotoxin binding sites of nicotinic acetylcholine receptors in mammalian cells with high signal/noise ratios. *Biophys. J.* 99, L81-L83
38. Masson, L., Prefontaine, G., Peloquin, L., Lau, P. C., and Brousseau, R. (1990) Comparative analysis of the individual protoxin components in P1 crystals of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* isolates NRD-12 and HD-1. *Biochem. J.* 269, 507-512
39. van, F. K., Gringorten, J. L., Milne, R. E., Gauthier, D., Pusztai, M., Brousseau, R., and Masson, L. (1991) Specificity of Activated CryIA Proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 for Defoliating Forest Lepidoptera. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1650-1655
40. Ding, H., Wong, P. T., Lee, E. L., Gafni, A., and Steel, D. G. (2009) Determination of the oligomer size of amyloidogenic protein beta-amyloid(1-40) by single-molecule spectroscopy. *Biophys. J.* 97, 912-921
41. Lenn, T., Gkekas, C. N., Bernard, L., Engl, C., Jovanovic, G., Buck, M., and Ying, L. (2011) Measuring the stoichiometry of functional PspA complexes in living bacterial cells by single molecule photobleaching. *Chem. Commun. (Camb.)* 47, 400-402
42. Garcia, H. G., Lee, H. J., Boedicker, J. Q., and Phillips, R. (2011) Comparison and calibration of different reporters for quantitative analysis of gene expression. *Biophys. J.* 101, 535-544
43. Gomez, I., Sanchez, J., Miranda, R., Bravo, A., and Soberon, M. (2002) Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix alpha-1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Lett.* 513, 242-246
44. Aronson, A. I., Geng, C., and Wu, L. (1999) Aggregation of *bacillus thuringiensis* Cry1A toxins upon binding to target insect larval midgut vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2503-2507

45. Schwartz, J. L., Juteau, M., Grochulski, P., Cygler, M., Prefontaine, G., Brousseau, R., and Masson, L. (1997) Restriction of intramolecular movements within the Cry1Aa toxin molecule of *Bacillus thuringiensis* through disulfide bond engineering. *FEBS Lett.* 410, 397-402
46. Haider, M. Z. and Ellar, D. J. (1989) Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal delta-endotoxin: interaction with phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 978, 216-222
47. Gazit, E. and Shai, Y. (1995) The assembly and organization of the alpha 5 and alpha 7 helices from the pore-forming domain of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. Relevance to a functional model. *J. Biol. Chem.* 270, 2571-2578
48. Torres, J., Lin, X., and Boonserm, P. (2008) A trimeric building block model for Cry toxins in vitro ion channel formation. *Biochim. Biophys. Acta* 1778, 392-397
49. Martin, F. G. and Wolfersberger, M. G. (1995) *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin and larval *Manduca sexta* midgut brush-border membrane vesicles act synergistically to cause very large increases in the conductance of planar lipid bilayers. *J. Exp. Biol.* 198, 91-96
50. Knowles, B. H. and Ellar, D. J. (1987) Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins with different insect specificity. *Biochim. Biophys. Acta* 924, 509-518
51. Carroll, J. and Ellar, D. J. (1993) An analysis of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin action on insect-midgut-membrane permeability using a light-scattering assay. *Eur. J. Biochem.* 214, 771-778
52. Villalon, M., Vachon, V., Brousseau, R., Schwartz, J. L., and Laprade, R. (1998) Video imaging analysis of the plasma membrane permeabilizing effects of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins in Sf9 cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1368, 27-34
53. Latorre, R., Vergara, C., and Hidalgo, C. (1982) Reconstitution in planar lipid bilayers of a Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channel from transverse tubule membranes isolated from rabbit skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 79, 805-809
54. Feng, Q. and Becktel, W. J. (1994) pH-induced conformational transitions of Cry IA(a), Cry IA(c), and Cry IIIA delta-endotoxins in *Bacillus thuringiensis*. *Biochemistry* 33, 8521-8526
55. Aronson, A. I. and Shai, Y. (2001) Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. *FEMS Microbiol. Lett.* 195, 1-8
56. Tigue, N. J., Jacoby, J., and Ellar, D. J. (2001) The alpha-helix 4 residue, Asn135, is involved in the oligomerization of Cry1Ac1 and Cry1Ab5 *Bacillus thuringiensis* toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5715-5720
57. Nair, M. S. and Dean, D. H. (2008) All domains of Cry1A toxins insert into insect brush border membranes. *J. Biol. Chem.* 283, 26324-26331
58. Tomimoto, K., Hayakawa, T., and Hori, H. (2006) Pronase digestion of brush border membrane-bound Cry1Aa shows that almost the whole activated Cry1Aa molecule

- penetrates into the membrane. *Comp Biochem. Physiol B Biochem. Mol. Biol.* 144, 413-422
59. Alzate, O., Hemann, C. F., Osorio, C., Hille, R., and Dean, D. H. (2009) Ser170 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab delta-endotoxin becomes anchored in a hydrophobic moiety upon insertion of this protein into *Manduca sexta* brush border membranes. *BMC. Biochem.* 10, 25

## Chapitre 4

# Automating single subunit counting of membrane proteins in mammalian cells

Hugo McGuire<sup>a,b,1,2</sup>, Mark R. P. Arousseau<sup>a,d,1,3</sup>, Derek Bowie<sup>a,d,4</sup> and Rikard Blunck<sup>a,b,c,5</sup>

<sup>a</sup>Groupe d'Étude des Protéines Membranaires (GÉPROM), Departments of <sup>b</sup>Physics and <sup>c</sup>Physiology, Université de Montréal, Montréal, QC, H3C 3J7 and <sup>d</sup>Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Montréal, QC, H3G 0B1, Canada

Received for publication July 17, 2012, and in revised form August 21, 2012

Published online August 28, 2012

*The Journal of Biological Chemistry*

Vol. 287, No. 43, pp. 35912–35921, October 19, 2012

Reproduced by permission of the *American Society for Biochemistry and Molecular Biology*

**Key words:** single-molecule; step detection; ionotropic glutamate receptors; cys-loop receptors; superfolder GFP

---

This work was supported in part by operating grants from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and the Canadian Institutes of Health Research (to R. B. and D. B.).

<sup>1</sup> Both authors contributed equally to this work.

<sup>2</sup> Recipient of a Fonds de Recherche du Québec-Nature et Technologies fellowship.

<sup>3</sup> Recipient of a Canadian Institutes of Health Research fellowship.

<sup>4</sup> Recipient of Canada Research Chair award in Receptor Pharmacology.

<sup>5</sup> Recipient of Canada Research Chair award on Molecular Mechanisms of Membrane Proteins. To whom correspondence should be addressed: Dépt. de Physique, C.P. 6128 Succ. Centre-ville, Université de Montréal, Montréal, Quebec H3C 3J7, Canada.

## Contribution des auteurs

Pour cette étude, j'ai modifié le montage en installant un système pour prendre les mesures de fluorescence sur les cellules en réflexion totale interne (TIRF). J'ai également développé la méthode d'analyse automatique (les algorithmes) et écrit le programme informatique en entier. J'ai effectué les simulations pour optimiser la méthode et évaluer la précision de l'algorithme. J'ai analysé les résultats obtenus et construit un autre programme pour évaluer les distributions binomiales en considérant que deux canaux pouvaient composer une région fluorescente analysée. J'ai finalement écrit la première version de l'article et contribué au design de la recherche (simulations, algorithmes, évaluation de la méthode).

Mark R.P. Aurousseau s'est occupé de la biologie moléculaire, de la transfection des cellules, de l'optimisation de l'expression et de la fixation des cellules pour que les échantillons soient adéquats pour la détection de canaux isolés. Il s'est également occupé de l'optimisation de la protéine fluorescente (msfGFP). Il m'a aussi assisté pendant la prise de mesures et a prodigué des conseils pour l'optimisation du programme informatique. Il a aussi participé à l'écriture de la première version de l'article et a édité plusieurs sections. Sa contribution s'inscrit finalement dans le design de la recherche (développement de msfGFP, optimisation de la biologie moléculaire pour détection de canaux unitaires, utilisation de cellules mammifères).

Derek Bowie a contribué au design de la recherche et à l'écriture de l'article en éditant le texte.

Rikard Blunck a contribué au design de la recherche et à l'évaluation de la précision de la méthode. Il a également édité l'article.

## 4.1 Capsule

**Background:** Although powerful, single subunit counting is time consuming, prone to user-bias and largely restricted to *Xenopus* expression.

**Results:** *PIF* is an automated analysis program that identifies subunit stoichiometry of any fluorescently-tagged membrane protein from TIRF-recordings.

**Conclusion:** *PIF* is accurate to more than 90% even in noisy data typical for mammalian expression system.

**Significance:** *PIF* approach is generalizable to any membrane protein and TIRF-microscope.

## 4.2 Summary

Elucidating subunit stoichiometry of neurotransmitter receptors is preferably carried out in a mammalian expression system where the rules of native protein assembly are strictly obeyed. Although successful in *Xenopus* oocytes, single subunit counting – manually counting photobleaching steps of GFP-tagged subunits – has been hindered in mammalian cells by high background fluorescence, poor control of expression and low GFP maturation efficiency. Here, we present a fully-automated single-molecule fluorescence counting method that separates tagged proteins on the plasma membrane from background fluorescence and contaminant proteins in the cytosol or ER and determines the protein stoichiometry. Lower GFP maturation rates observed in cells cultured at 37°C were partly offset using a monomeric version of superfolder GFP. We were able to correctly identify the stoichiometry of GluK2 and  $\alpha 1$  glycine receptors. Our approach permits the elucidation of stoichiometry for a wide variety of plasma-membrane proteins in mammalian cells with any commercially available TIRF microscope.

## 4.3 Introduction

The vast majority of membrane-bound proteins are expressed as oligomeric complexes in either homo- or heteromeric forms. Given this complexity, a number of biochemical and imaging techniques have been employed to elucidate subunit number and stoichiometry. As a first approximation, stoichiometry is often assessed by bulk biochemical methods, such as blue native polyacrylamide gel electrophoresis (1). However for a

quantitative estimate, more recent approaches have turned to spectroscopic techniques such as fluorescence energy transfer (2) or protein x-ray crystallography (3,4). Though helpful, methods that infer subunit stoichiometry from ensemble measurements ultimately assume that copy number is invariant amongst protein complexes. To take this issue into account, stoichiometry can be determined by studying protein complexes at the single molecule level either with atomic-force microscopy (5) or fluorescence spectroscopy (6-11). In particular, the single subunit counting technique has proven to be a powerful tool (7,11-18). For this technique, each subunit is first tagged with a fluorescent marker and then viewed by total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy which limits background noise in favor of signals coming from the plasma membrane (19). By minimizing surface expression levels, fluorescence emitted by individual protein complexes can be resolved. For each complex, the number of photobleaching steps can then be counted and, by association, the subunit stoichiometry determined (9,10). This strategy is particularly appealing when expressing the protein of interest in the *Xenopus laevis* oocyte since it permits the use of GFP-tagged subunits as well as providing measurements with high signal-to-noise ratio (7).

Despite its value, an important caveat of this approach is that the oocyte's biochemical machinery does not always assemble mammalian proteins faithfully. For example, the stoichiometry of human neuronal nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) was found to be different between *Xenopus* oocytes and mammalian cells (20,21). An added complication is that proteins nascent to the oocyte can co-assemble with exogenous proteins, as shown for nAChRs (22) and NMDA-type ionotropic glutamate receptors (23). This situation is unlikely to be limited to a few exceptions since the *Xenopus* oocyte expresses a plethora of ion-channels and transporters that are orthologs of mammalian proteins (24-26). Although the ideal solution would be to perform subunit counting in mammalian cells, this approach has its own challenges. First, background noise is greater in mammalian cells making it more difficult to discern the desired signal emitted from transfected cells. Second, surface protein density is more difficult to control in mammalian cells compared to *Xenopus* oocytes leading to heterogenous expression patterns and to occasional colocalization of proteins. This means that in spite of the time-consuming nature of the analysis, practically all proteins expressed on the cell surface have to be analyzed to prevent biasing the outcome to a



certain subpopulation. Third and finally, post-translational formation of the GFP chromophore is less efficient at the higher temperatures needed for mammalian cell cultures (i.e. 37°C) (27,28) placing limits on the accuracy of the counting method.

To respond to these challenges, we developed the necessary tools to make single subunit counting experiments in mammalian cells possible. Concerns with low chromophore formation were addressed by constructing a monomeric version of GFP (29) based on superfolder GFP (30) (msfGFP; see *Experimental Procedures*). To enable unbiased analysis of all proteins expressed on the cell membrane, we have developed a fully-automated counting program that is capable of resolving steps typical of noisy *in situ* photobleaching experiments. It does so by separating relevant signals from contaminants, extracting the bleaching traces also from high background levels and classifying these according to number of bleaching steps. The counting program has been named *PIF* to reflect the “**P**rogressive **I**dealization and **F**iltering” functions of step detection and to recall the French expression *avoir du pif*, meaning “to have intuition” or literally “to have a good nose for something”. Using this approach, we have successfully determined the tetrameric and pentameric stoichiometry of GluK2 kainate and  $\alpha$ 1-glycine neurotransmitter receptors, respectively. Given this, we propose that *PIF* can be viewed as a universal tool for the automated analysis of subunit counting data of membrane-bound proteins expressed in mammalian cells.

## 4.4 Experimental procedures

### 4.4.1 Cell culture and transfection

HEK293T cells were plated on poly-D-lysine-coated 35mm #1 glass bottom dishes (MatTek Corporation) at a density of  $2.5 \times 10^4$  cells/mL in DMEM (Invitrogen) supplemented with fetal bovine serum (2%; Gibco). Cells were maintained in a humidified incubator at 37°C containing 5% CO<sub>2</sub>. After 25-30 hours, cells were transfected by the calcium phosphate method. Precipitate was allowed to form for 4 hours before cells were washed twice with PBS and placed back into fresh DMEM. Cells were allowed to recover between 16-22 hours post-transfection before being fixed in EM-grade 4% formaldehyde (Ladd Research) in PBS for 24-36 hours at 4°C.

#### 4.4.2 *Plasmid construction*

Monomeric superfolder GFP (msfGFP) contains a lysine residue at amino acid position 206 (V206K), known to substantially reduce fluorophore dimerization (29). The monomeric form of the superfolder GFP (msfGFP) was inserted into the coding sequence of the rat ionotropic kainate receptor GluK2 (NM\_019309; pRK5-msfGFP-GluK2) and the human glycine receptor GlyR $\alpha$ 1 (NM\_000171; pRK5-msfGFP-GlyR $\alpha$ 1 utilizing a large-insert mutagenesis protocol (31). For both constructs, msfGFP was inserted N-terminally between the first and second or third and fourth amino acids of the mature GluK2 or GlyR $\alpha$ 1 proteins, respectively. The fusions were generated by large-insert site directed mutagenesis. Briefly, primers were designed to incorporate a 20-23 nucleotide overhang into both the 5' and 3' ends of the msfGFP sequence. These overhangs are complementary to regions directly before and after the desired point of msfGFP insertion in expressions plasmids containing either the GluK2 or GlyR $\alpha$ 1 sequence. Primers are used to generate a megaprimer by PCR, which, after purification, is in turn utilized as a primer for large-insert site-directed mutagenesis of the target sequence. All constructs were verified by sequencing.

#### 4.4.3 *Imaging*

Fluorescence was measured using an inverted microscope (Axiovert 200, Zeiss, Jena, Germany). Excitation was achieved in total internal reflection fluorescence (TIRF) configuration using a 60 mW 488 nm laser (PhoXx, Omicron-Laserage, Germany). TIRF allows a thin excitation height of about 200 nm above the coverslip, thus eliminating a huge proportion of the background emerging from different cell compartments. Excitation light (~10.5 mW) was defocused to a diameter of approx. 35 mm and was partially cut to a diameter of ~7 mm using an iris, thus allowing a very uniform excitation intensity over the region observed. The total excitation intensity at the exit of the objective was about 550  $\mu$ W. Emission was collected with a 63x NA 1.49 objective (Olympus, Richmond Hill, ON) and filtered by a high efficiency 525/50 nm emission filter in combination with a Z488 dichroic mirror (Chroma Technologies, Rockingham, VT). Images were recorded with a backlit EMCCD Camera (iXon+ 860BV, Andor Technology, South Windsor, CT) at a sampling rate of 20 Hz.

#### 4.4.4 *Generating simulated data*

Data featuring variably photobleaching, variations in step size and blinking were simulated using a hidden Markov model (Supplemental Fig. S4.1 A). For simplicity, blinking events following single transition kinetics were considered. The mean dwell time  $\tau$  in each state was calculated by the inverse of the sum of rates leaving the state. The duration  $t$  in which a state will be visited is calculated using a generated random number between 0 and 1, exclusively, to which an exponential decay function with characteristic time  $\tau$  is associated. The result is then sampled at a frequency of 20 Hz, except for the simulations with fast blinking events ( $\alpha \geq 50$ ), which are first sampled at 200 Hz before being re-sampled at 20 Hz. After this period in a given state, the next state is randomly selected based on the rate constants, acting as weights. This process is repeated until a duration of 100 sec is reached. Poisson noise is finally added to the idealized trace.

#### 4.4.5 *Definition of fluorescent spots*

The fluorescence intensity of each spot had a contributing region of 3x3 pixels defined by the point spread function of the imaging system. The signal  $\delta F$  is obtained by fitting the initial total fluorescence intensity  $F$  of each spot to a 2D Gaussian profile and subtracting the estimated baseline from the total fluorescence. A spot was detected if the signal to total fluorescence ratio  $\delta F/F$  overcame a pre-defined cut-off. In addition, an “overlap limit” ensured that individual spots do not influence each other’s fluorescence intensity. The limit was defined as the distance where the Gaussian profile has reached 20% of its maximum and had to be free of neighboring spots.

#### 4.4.6 *Trace filtering*

Background fluorescence was removed by convoluting a *Laplacian of Gaussian* (LoG) kernel with the matrix of each selected spot (Fig. 4.1 B). The filtering step effectively applied a band-pass filter similar to a deconvolution algorithm applied to confocal images to increase resolution and remove blurring (32). The LoG kernel has a standard deviation corresponding to the mean value obtained from the Gaussian fit over a set of spots. This filter

is especially useful in low SNR systems because it efficiently removes high background fluorescence.

Individual traces were further filtered with the *Chung-Kennedy (C-K) filter* (33). This non-linear filter has been designed to reveal transients dominated by noise and has been shown to be an efficient aid for step detection (33,34). Briefly, each of the points comprising a trace was filtered by a weighted average with the neighboring points directly preceding and following within a fixed time window. Weighting was evaluated for each point and was based on the variance of the trace before and after that point. The C-K filter improved the SNR by a factor of approx.  $3.0 \pm 0.5$  and did not filter out any bleaching steps. Interestingly, for  $\text{SNR} > \sim 2$ , the filter reduces the overall accuracy by up to 7%. A C-K filter should therefore only be used if traces display a SNR below  $\sim 2$ . According to our estimations, C-K filtering should be applied for experimental traces improving their filtered SNR to values typically around 4-5 (Supplemental Fig. S4.1 B).

#### 4.4.7 *Step detection*

The program's step detection algorithm identifies segments of constant intensity. This is an iterative process where initially short segments are averaged, and averaged data are exposed to another iteration of the same algorithm. This gradual increase in segment duration ensures that steps are readily distinguished. The main task of the step detection algorithm is to separate bleaching steps from noise or blinking events. This requires information on noise and step amplitudes, both of which are initially unknown. As a direct determination of the noise level is prevented by the step-wise decrease of the baseline during bleaching events, the noise is estimated by evaluating variations of the fluorescence fluctuations ( $N_{FF}$ ). Briefly,  $N_{FF}$  is obtained by calculating the standard deviation of the intensity differences between adjacent frames (for details see *Supplemental Text*). This value serves as the basis for the calculation of the SNR of the trace. Since also the step amplitudes (the signal) are initially unknown, the algorithm assumes a very small SNR ( $\sim 0.25-1$ ) for the first step detection iteration. Starting from the first frame, it continuously calculates a "floating" baseline as the average of the intensity data. If the intensity falls below a limit  $\sigma = (\text{SNR} \cdot N_{FF})/\phi$  from the calculated average, a step is detected and the algorithm assumes a new baseline. The "sensitivity"  $\phi$  –

used to determine the threshold – is an empirical calibration factor dependent on the SNR of the current trace (Supplemental Fig. S4.1 C). For subsequent iterations, the SNR is calculated using the step amplitudes resulting from the previous iteration.

In the first iteration of a trace, many more steps will be detected than actually present. However, the “idealized” trace obtained in each run will undergo subsequent iterations with a lower sensitivity  $\varphi$  – calculated each round from the newly obtained idealized trace – so that noise and arbitrary fluctuations are progressively eliminated until only true bleaching steps remain (Supplemental Fig. S4.2). This process stops if no further reduction of steps is observed in successive iterations of the algorithm. A more detailed description of the algorithm can be found in the supplemental information.

Three step properties are evaluated in the detection algorithm in order to reduce false detections caused by artifacts created occasionally when working in mammalian cells. These properties are the minimal time permitted between steps, the maximal step amplitude variation and the minimal step amplitude (Supplemental Fig. S4.3 A-D). Notably, the minimal time between steps must last at least two frames because each individual photobleaching event is likely to occur during any given exposure interval. The new fluorescence intensity is therefore only registered in the second frame whereas the first will assume an intermediate value. The variation of the step amplitudes was limited to exclude false steps, whose amplitudes were small in comparison to those of msfGFP bleaching steps within the same trace. The msfGFP bleaching steps displayed similar amplitudes amongst each other. This criterion proved most important and ruled out most of the detection artifacts in typical recordings of HEK293 cells. Limiting the maximal amplitude variation to 60% of the largest step in the trace removed the artifacts while still tolerating variations due to blinking events. 60% variation also accepts two fluorophores photobleaching during one frame exposure. Steps that did not fulfill all three criteria were not counted.

#### 4.4.8 *Quality control*

Despite PIF’s accuracy in step detection, not all artifacts were ruled out. In particular, some traces were still analyzed that did not display any step-wise behavior (e.g. from “dirt” particles). This is a problem specific to automated algorithms. While a user would by eye

ignore these traces at once, the algorithm will accept them as long as the detected “steps” do not violate any of the above step detection criteria. The algorithm has to be instructed specifically which traces to discard. For this purpose, a set of five evaluation criteria were built into the software as a final quality control. These rejection criteria were found to be good indicators for the presence of contaminants contributing to trace artifacts. They include threshold values for a Chi-squared goodness-of-fit evaluation ( $\chi^2 > 1.5$ ), for a minimal SNR, for the step duration as well as for the step amplitude. The  $\chi^2$  of the traces also had to be smaller than the  $\chi^2$  of a counterfit (35) (for details see *Supplemental Text*). If an idealized trace fails to meet the requirements of any of these criteria, it is omitted from analysis.

#### 4.4.9 Determination of accuracy

The algorithm’s step detection accuracy  $p_{acc}$  was evaluated for each SNR. Evaluation of the accuracy was achieved by computing the probability of correctly detecting exactly one step where exactly one step truly existed. Briefly, for each SNR, a step distribution histogram is obtained, from which the proportion of each detected step number is calculated. To correctly determine the accuracy, it is necessary to consider that simultaneous false step detections and missed events within the same trace would compensate for one another. Such errors could result in “falsely” finding the correct overall step number present in a given trace. Consequently, the calculation of the accuracy takes the probability of missed events and false step detections into account.

#### 4.4.10 Simulations: calculation of the accuracy $p_{acc}$

We define the accuracy  $p_{acc}$  as the probability of correctly detecting one step when exactly one step exists. If PIF was applied to simulated photobleaching data containing exactly 11 steps,  $p_{acc}$  could be derived from the resulting observed step distribution. As a first approximation based on the frequency of identifying 11 steps ( $P(11)$ ), one could reason that  $P(11) \sim p_{acc}^{11}$ . However, there are several ways to attain a final count of 11 steps. For instance, step detection errors could result in including a step that does not truly exist (false detection) and/or in missing an existing step (missed event). A false detection and a missed event occurring in the same trace would result in an apparently accurate final step count, leading to

an overestimation of  $p_{acc}$ . To correct for such situations in the context of calculating  $p_{acc}$ , we defined the theoretical frequency distribution of detecting  $N$  steps for  $N_{real}$  real steps:

$$P(N) = \sum_{k=0}^{\text{floor}(N/2)} \frac{N_{real}!}{(N-2k)!(k+N_{real}-N)!k!} p_{acc}^{N-2k} p_0^{k+N_{real}-N} p_2^k \quad \text{if } N < N_{real} \quad (\text{eq. 4.1})$$

$$P(N) = \sum_{k=N-N_{real}}^{\text{floor}(N/2)} \frac{N_{real}!}{(N-2k)!(k+N_{real}-N)!k!} p_{acc}^{N-2k} p_0^{k+N_{real}-N} p_2^k \quad \text{if } N \geq N_{real} \quad (\text{eq. 4.2})$$

where  $p_0$  and  $p_2$  are the probabilities of missing a step and counting 2 steps for one real step, respectively. The factor at the beginning of each term represents all the arrangements of  $p_{acc}$ ,  $p_0$  and  $p_2$ , as each event could happen in any order. The resulting theoretical distribution  $P(N)$  was then fitted to the observed step distribution as a function of  $p_{acc}$ ,  $p_0$  and  $p_2$ . This fit was performed by minimizing the difference between our calculations and the actual distribution (Levenberg-Marquardt algorithm).

#### 4.4.11 Kinetics of fluorescent protein blinking

Two rate constants  $\alpha$  and  $\beta$  determine the transitions out of and into the non-fluorescent state, respectively. For a constant photobleaching rate of  $\kappa = 0.1 \text{ s}^{-1}$ , we varied blinking frequency and duration ( $\alpha = 1, 5, 10$  and  $50 \text{ s}^{-1}$ ;  $\beta = 0.1$  and  $1 \text{ s}^{-1}$ ; Supplemental Fig. S4.4). For both  $\beta$  values tested, step detection accuracy decreased slightly with increasing blinking duration (decreasing  $\alpha$ ). For blinking events with long duration ( $\alpha \leq 5 \text{ s}^{-1}$ ), the decrease was significant even at  $\text{SNR} > 2$ . Although for a moderate blinking rate ( $\beta = 0.1 \text{ s}^{-1}$ ) the detection accuracy always remained above 90% for  $\text{SNR} > 2$ , for a high blinking rate ( $\beta = 1 \text{ s}^{-1}$ ), 90% accuracy could only be achieved when  $\alpha \geq 10 \text{ s}^{-1}$ , i.e. if the events were not too long-lived.

The above values for simulated blinking events were chosen to test the limitations of the algorithm and do not actually represent the conditions typically observed in experimental fluorescence recordings. To verify the blinking properties under typical conditions, we obtained experimental traces recorded from HEK293T cells expressing a monomeric form of ‘‘superfolder GFP’’ (msfGFP) (30) fused to GluK2 (see below). To obtain the experimental blinking rates  $\alpha$  and  $\beta$  the traces were fitted to a hidden Markov model using QuB (36,37). We chose traces with particularly prominent blinking events to ensure precise computation of the

blinking rate constants. Analysis resulted in two different phenotypic populations; a first population typified by long low frequency blinking events with mean values for  $\langle\alpha\rangle$  and  $\langle\beta\rangle$  of  $1.27 \pm 1.05 \text{ s}^{-1}$  and  $0.013 \pm 0.07 \text{ s}^{-1}$ , respectively (N = 7). By contrast, a second population represented by the majority of traces exhibited a greater number of shorter blinking events with mean values for  $\langle\alpha\rangle$  and  $\langle\beta\rangle$  of  $12 \pm 14 \text{ s}^{-1}$  and  $0.12 \pm 0.11 \text{ s}^{-1}$ , respectively (N = 12).

#### 4.4.12 *Software*

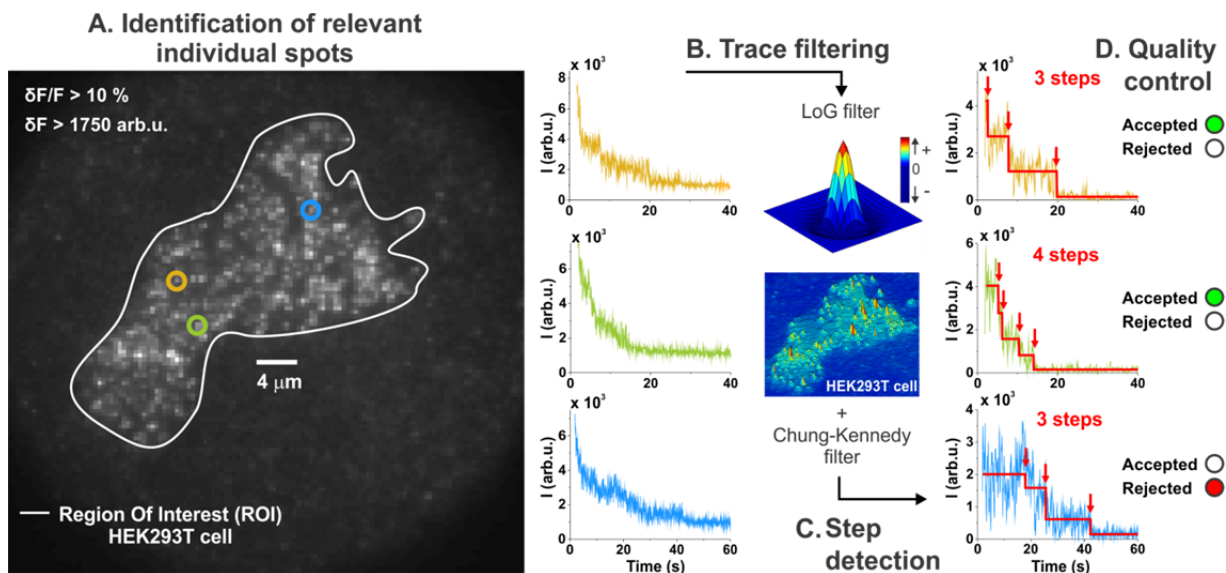
PIF was entirely programmed and is run using Matlab (Mathworks, Nattick, MA).

## 4.5 Results

### 4.5.1 *Identification of relevant spots*

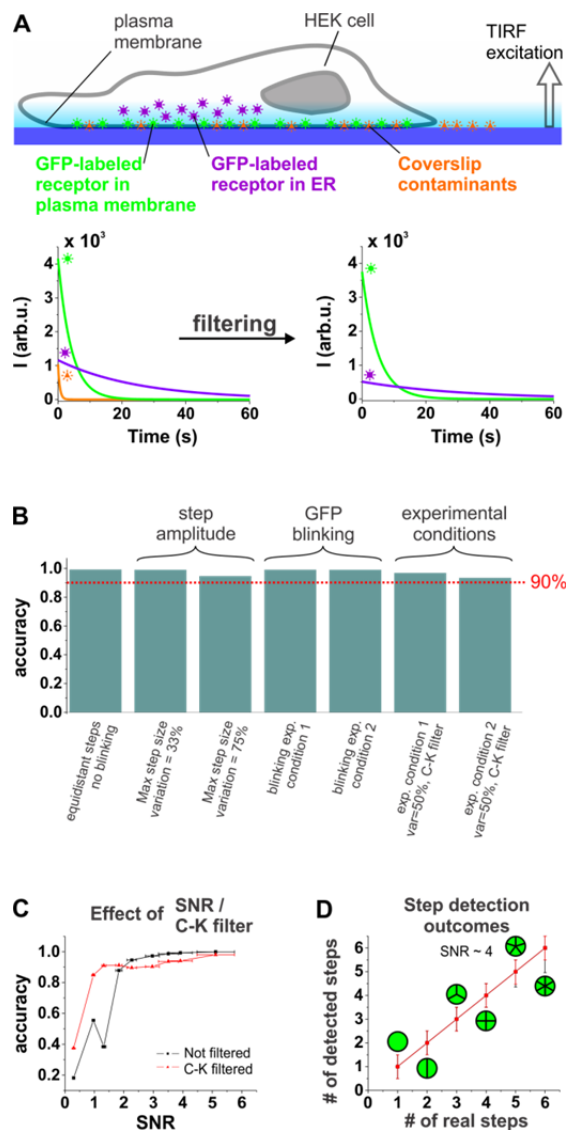
When performing single molecule fluorescence in mammalian cells, a multitude of spots varying in intensity and distribution are found (Fig. 4.1 A). Manually selecting a number of these spots introduces a user bias such that a certain sub-population (the “good-looking” ones) of proteins is favored at the expense of another. This is particularly pertinent when considering neuronal cells which invariably have a heterogenous receptor expression pattern. It is therefore imperative, first, to detect all spots in the region of interest and, then, to separate relevant spots, originating from the tagged protein located on the plasma membrane, from contaminant spots by objective criteria independent of the respective user. In order to process the large number of spots found on a single mammalian cell, each relevant fluorescent spot had to be detected and analyzed in an automated fashion (Fig. 4.1 A-D).





**Figure 4.1** | (A-C) PIF automated analysis. (A) Spots of interest are automatically selected from a user-defined region which encloses the cell (ROI). The fluorescence intensity of 3 spots are shown as examples. (B) Individual spots are processed through a background removal LoG-type kernel with a standard deviation set to 0.76 pixels. The resulting trace is filtered with the so-called C-K algorithm using a fixed time window of 3 frames (150 ms). (C) PIF next applies its step detection algorithm to build an idealization of these traces, from which the steps are counted. Ultimately, a quality control based on 5 criteria determines whether the final result should be included or not in the counting analysis.

In our automated analysis, spot identification was limited to a user-defined region of interest (ROI) delineating the borders of a cell expressing the fluorescently-tagged protein (Fig. 4.1 A). To resolve single spots, background intensity originating from within cells was suppressed by utilizing total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy which limits excitation to the areas close to the plasma membrane (38). However, TIRF configuration does not prevent excitation of any contaminant spots located close to the plasma membrane or within the penetration depth of the evanescent wave into the cytosol (approx. 0.3  $\mu\text{m}$ ). Both factors gave rise to contaminant spots that were difficult to distinguish from relevant spots corresponding to individual protein complexes (Fig. 4.2 A).



**Figure 4.2** | (A) Scheme of a HEK cell under TIRF illumination. GFP labeled proteins located in plasma membrane and endoplasmic reticulum (ER) can be excited. Other excited contaminant molecules are located directly on the coverslip. The global fluorescence decay of each three regions is shown before and after background removal. (B) The accuracy of the step detection algorithm was evaluated from simulations of various photobleaching step conditions. These include the simulation of traces mimicking the experimental conditions, which were C-K filtered because of the initially low SNR observed in msfGFP-based experiments. Each set of simulation comprises about 500 individual photobleaching traces (C) The accuracy is calculated for each SNR from simulation of traces exhibiting equidistant photobleaching steps in absence of blinking events. The relationship between the accuracy and SNR is illustrated both before (*black squares*) and after Chung-Kennedy (C-K) filtering (*red triangles*). (D) Typical experimental conditions were used to simulate traces containing 1 to 6 steps with a final SNR of  $\sim 4$  after C-K filtering. The maxima of the detected step number distribution are plotted against the actual number of steps present in the trace. The error was evaluated using full-width at half maximum.

Common contaminant sources include macromolecules present at the surface of the glass coverslip as well as endogenous proteins of the cell. For instance, flavins are abundantly expressed in the cytosol and are known to have spectral properties similar to GFP, albeit with much lower extinction coefficient and quantum yield (39,40). Thus, they fluoresce with significantly lower intensity than proteins tagged with a fluorescent protein variant. Similarly, proteins located at a distance of more than 200 nm from the plasma membrane in the cytosol fluoresce with very low intensities when using TIRF excitation. This allowed us to rule out many contaminant spots by defining a threshold for the fluorescence intensity of the spots (Supplemental Fig. S4.1 D).

Other contaminants that exhibited fluorescence intensity comparable to our proteins of interest were not so easily distinguished. These were contaminants positioned so close to the membrane that their fluorescence intensity was not reduced by TIRF excitation. Some contaminants were also observed in the absence of tagged proteins and thus attached to the coverslip surface (Fig. 4.2 A, *orange*). Also tagged proteins retained in the ER were still detected in mammalian cells (Fig. 4.2 A, *violet*). In oocytes, the ER is positioned at a distance of more than 1  $\mu\text{m}$  from the plasma membrane (41) and is optically shielded by the strong pigmentation just below the membrane. In contrast, in mammalian cells, the ER comes so close to the plasma membrane that proteins therein are still excited in TIRF configuration. We tested this by transfecting HEK293 cells with a Kainate receptor that is retained in the ER (GluK5 fused to msfGFP). Even under TIRF excitation, proteins in the ER were still clearly detectable with intensities not significantly lower than proteins expressed at the plasma membrane. These spots had to be excluded because they might have been retained in the ER exactly because they did not exhibit the correct subunit composition.

We found that both types of contaminants, spots on the coverslip and tagged proteins in the ER, were despite their comparable fluorescence intensity distinguishable from relevant spots in their photobleaching decay times. On clean coverslips devoid of cells, a *fast* fluorescence decay was observed and could accordingly be attributed to background arising from impurities (Fig. 4.2 A, *orange*). When expressing the trafficking deficient mutant GluK5-msfGFP, we found a very *slow* decay. The longer distance for proteins in the ER, and thus lower TIRF excitation, leads to lower excitation intensities and, by association, slow bleaching

time constants (Fig. 4.2 A, *violet*). The remaining *medium* component was the relevant component associated with the photobleaching of the msfGFP-fluorophores (Fig. 4.2 A, *green*).

To remove fluorescence from the undesired fast and slow components, we applied a *Laplacian-of-Gaussian* (LoG) filter (Fig. 4.1 B), which is known from deconvolution of confocal images to increase resolution and remove blurring (see Experimental Procedures, 32). Prior to filtering, the contaminant fast and slow components each accounted for 15-20% of the overall fluorescence leaving 60-70% attributed to the relevant msfGFP fluorescence. Filtering completely removed the fast background component and substantially attenuated the slow contaminant component, resulting in 90% fluorescence from the proteins of interest (Fig. 4.2 A). At this time, we separated the complete ensemble of spots originating from tagged proteins on the plasma membrane from any contaminants. The associated fluorescence traces were finally filtered to increase their signal to noise ratio (Chung-Kennedy filter; Fig. 4.1 B) before entering the step detection phase.

#### 4.5.2 Step detection algorithm PIF

In the second phase, the automated step detection algorithm is applied to every fluorescent trace from relevant spots identified above (Fig. 4.1 C; see *Experimental Procedures* and *Supplemental Text* for a detailed description of the algorithm). Other step detection algorithms, designed to work at the high noise levels that are typically observed in mammalian cells, detect deviations larger than the noise level and compare them to the “signal” amplitude. In the case of photobleaching, this strategy is not practicable as both signal to noise ratio and the expected intensity levels (or even their number) cannot be determined *ad hoc* but are irreversibly intertwined with the number of steps that we wish to measure. In the PIF algorithm, this problem was solved by considering the variations of intensity rather than the noise (*Supplemental Text*) and by using a slow iterative process to detect the steps. We found that direct detection is more likely to miss a step or not to filter out artifacts. PIF, on the other hand, is initially overly sensitive and detects any “ripple”, but, with each iteration and decreasing sensitivity, these are smoothed out until only the real steps are crystallized out. Steps in the idealized traces were finally analyzed according to a number of objective criteria

to rule out any artifacts (see *Quality Control in Experimental Procedures*; Fig. 4.1 D). PIF recognized each step in data typical for experimental conditions with an accuracy of more than 90% (Fig. 4.2 B, see below).

### 4.5.3 Testing step detection by PIF in simulations

We tested how well the PIF algorithm finds the correct photobleaching steps from noisy traces in simulated data. We simulated traces traversing 11 equidistant steps following a hidden Markov model with signal to noise ratios (SNR) between 0.33 and 5.75 (see *Experimental Procedures*). We determined the accuracy of step fitting to be higher than 90% for SNRs over  $\sim 2$  without filtering (Fig. 4.2 C, *black trace*). The accuracy was significantly improved by C-K filtering at low SNRs, and 90% accuracy was achieved for SNR  $> 1.2$  (Fig. 4.2 C, *red trace*).

Since fluorophores exhibit variable intensities (42), also the amplitudes of photobleaching steps are not necessarily identical but exhibit variations to some degree. Amplitudes vary typically by 33% under experimental conditions. We allowed the step amplitudes to vary in simulated data 33% and 75% representing a typical and extreme value, respectively. In both cases, step detection accuracy was not substantially altered and remained above 90% (Fig. 4.2 B).

Most subunit counting experiments are performed using fusion constructs with fluorescent proteins such as GFP and its derivatives. These fusion constructs evade any problems of unspecific labeling or accessibility, as expected for labeling with organic fluorophores (15,43) or antibodies (11), respectively. However, GFP and its derivatives have been shown to exhibit recurrent short dark periods in their emission known as blinking (44,45). The onset of each dark period is comparable to a photobleaching step, but differs in that it recovers to the original intensity. We tested the effect of blinking on step detection accuracy of PIF in simulated traces containing four steps of equal amplitude (Fig. 4.2 B). The kinetics of photobleaching were obtained from TIRF recordings with an iGluK2 fusion construct with the monomeric version of superfolder GFP (msfGFP, see below) expressed in HEK293 cells (see *Experimental Procedures*). Both sets of kinetic parameters found were tested in simulations, and neither had a significant effect on the accuracy of step detection of

the PIF algorithm (Fig. 4.2 B). Combining values of both the variations in step amplitude and the blinking rates typical for photobleaching data obtained from mammalian cells, PIF's step detection accuracy, still, was found to be over 90% (Fig. 4.2 B).

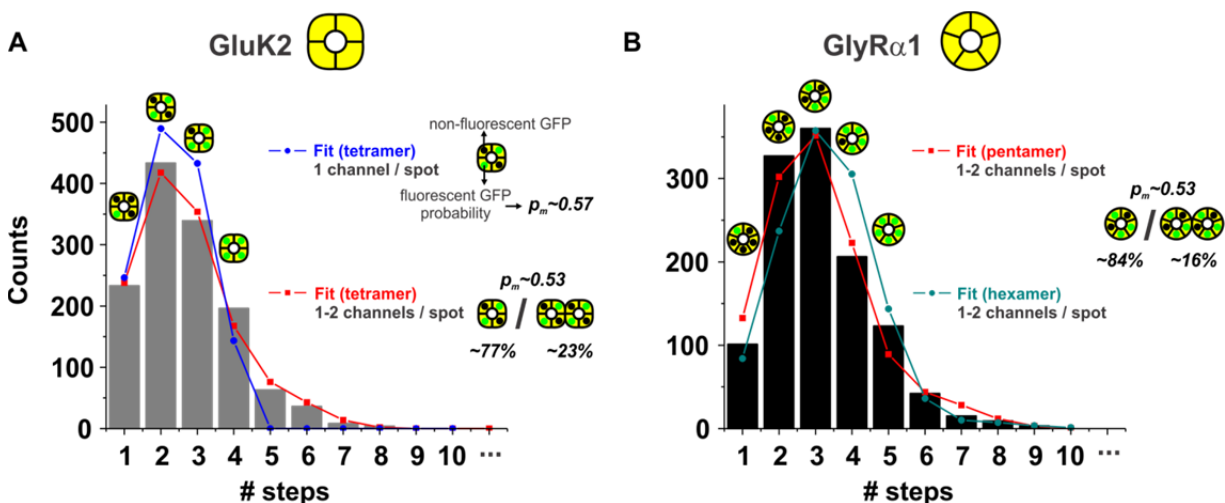
We, finally, tested how well PIF determines the correct stoichiometry for different oligomers. We simulated photobleaching data with experimental parameters of different stoichiometries, i.e. 500 traces each for monomers, dimers up to hexamers, and let PIF analyze these data in an automated fashion. On average, each step was found with an accuracy of over 90%, and the maxima of the distributions were exactly at the correct value (Fig. 4.2 D). These simulations confirmed the capability of PIF to determine the correct stoichiometry of a multimeric protein under experimental conditions.

#### 4.5.4 *Fluorescent subunit counting in mammalian cells*

Fluorescent subunit counting data were collected from fixed HEK293T cells transiently transfected with a fluorescently-tagged ligand-gated ionotropic glutamate receptor GluK2. HEK293T cells as recombinant expression system are typically used for expression of membrane proteins and offer particular advantages with respect to the neuronal ion channels analyzed in this study. Unlike *Xenopus laevis* oocytes (46), HEK293T cells do not endogenously express kainate receptors. Furthermore, despite their origin as kidney cells, HEK293T cells share a common mRNA transcription profile with neurons (47). This final point gives confidence that the ion channels such as GluK2, which are natively expressed almost exclusively in neurons, keep their inherent stoichiometry when expressed either in homo- or in heteromeric form.

msfGFP was fused at the N-terminal extremity of GluK2, and cells were imaged using TIRF microscopy. Under these conditions, cells exhibiting low msfGFP-GluK2 expression levels showed single molecule fluorescence clearly visible above background fluorescence levels (Fig. 4.1 A). If expression density or background fluorescence was substantial, cells were automatically removed from analysis because too many traces were rejected by *PIF*. Typically,  $50 \pm 8\%$  of traces were excluded from counting analysis by the program, however, recordings resulting in more than 70% trace rejection were not considered for analysis, as such recordings indicated inappropriate cell selection. For all other cells, PIF

automatically analyzed the recordings and accumulated the step number histogram (Fig. 4.3 A).



**Figure 4.3** | (A-B) PIF automated analysis over GluK2 and GlyR $\alpha$ 1. (A) The final step distribution of msfGFP-GluK2 (bars) is fitted to a binomial distribution of 4th order (tetramer) either for purely single-channel spots (blue circles) and allowing the possibility of two channels on the same spot (red squares). The resulting probabilities to detect fluorescence from a fluorescent protein were  $p_m = 57\%$  and  $53\%$  for purely single and combined single and double occupancy, respectively. For the latter, the fraction of single occupancy was  $77\%$ . (B) The final step distribution of msfGFP-GlyR $\alpha$ 1 was fitted to a 5th order binomial distribution (pentamer) and reveal an identical  $p_m = 0.53$  as well as a similar single occupancy ( $84\%$ ) to msfGFP-GluK2. The distribution was also fitted to a 6th order binomial distribution (hexamer) with  $p_m$  set to  $0.53$ .

Finally, the step number histogram that we obtained from the automated analysis remained to be interpreted. If all GFP molecules were fluorescent, the step number would match the number of subunits per protein assembly. Unfortunately, however, each fluorescent protein has only a certain probability ( $p_m$ ) of being fluorescent defined by the ability of the chromophore to fold and mature correctly (7,48). As all identical fluorophores have an equal probability of fluorescing ( $p_m$ ), the resulting step number histogram has to follow a binomial distribution dependent on this maturation probability. Previous reports counting eGFP-fusion proteins expressed in *Xenopus laevis* oocytes matured at  $\sim 18^\circ\text{C}$  have estimated  $p_m$  values between  $75\%$  and  $80\%$ . Such maturation rates were not achieved at  $37^\circ\text{C}$  required for mammalian cell culture. To optimize maturation rates as much as possible, we constructed a

monomeric version of the superfolder GFP msfGFP (29,30). The monomeric version of GFP prevented protein-protein interactions between GFPs which might influence stoichiometry.

Consistent with the known homotetrameric assembly of GluK2-msfGFP, the step histogram generated automatically by PIF was best fit by a binomial distribution of 4<sup>th</sup> order (Fig. 4.3 A, *blue trace*). Interestingly, a fraction of spots exhibited between 5 and 8 steps, which were not considered for the fit. They strongly suggested some cases where two receptors occupied a single spot. Whether this is a result of inadequate system resolution or is biologically relevant remains currently unknown. To account for the fraction of spots with two receptors, the binomial distribution was adjusted to consider both possibilities (*Supplemental Text*), which significantly improved the fit (Fig. 4.3 A, *red trace*), and we were able to estimate that approximately 23% of the spots contained two receptors.

The maturation probability of GFP only depends on the expression system and the temperature during maturation and not on the protein it is fused to (30). This value has to be determined once for a given expression system with a protein of known subunit composition (here 53%), and will remain constant for any further protein. The distribution will then only depend on the order of the binomial given by the number of subunits. To confirm the universal validity of the maturation probability  $p_m$ , PIF was applied to another ion channel of known stoichiometry. The above experiments defined  $p_m = 0.53$  for our expression system. We now expressed a msfGFP-tagged alpha1 glycine receptor (GlyR $\alpha$ 1) and automatically analyzed the subunit counting data. As before, the best fit was obtained assuming two receptors could occupy a single resolvable spot, evident in the detection of several traces containing 6 to 9 photobleaching steps. Similar to GluK2, ~84% of spots were estimated to contain individual GlyR $\alpha$ 1 receptors. The step number histogram was fit with double-binomial distributions of 5<sup>th</sup> (pentamers) as well as 6<sup>th</sup> order (hexamers; Fig. 4.3 B). However, only the pentameric stoichiometry reported a  $p_m$  of 53%, a value identical to that obtained in GluK2 experiments, whereas the hexameric stoichiometry required  $p_m = 46\%$ . A hexameric distribution with a  $p_m = 53\%$  was clearly not able to follow the obtained distribution (Fig. 4.3 B). By calibrating the system with a defined maturation rate  $p_m$ , we can thus determine unambiguously the stoichiometry of a membrane protein in spite of the low maturation rate of fluorescent proteins in mammalian cells.



## 4.6 Discussion

In this study, we provide a complete framework to study the stoichiometry of any membrane protein in a mammalian expression system using single subunit counting. First, we have developed a fully-automated subunit counting algorithm, *PIF*, that greatly minimizes user-bias in discerning photobleaching steps from background noise. The automation of step detection has the added advantage of permitting the analysis of large datasets over a short time period minimizing the risk of analyzing only part of a heterogenous population. Second, *PIF* is able to reliably extract the relevant signal from records with relatively low signal-to-noise ratio enabling to routinely study the stoichiometry of a wide variety of membrane proteins expressed in mammalian cells. This feature resolves the emerging concern of performing similar experiments in *Xenopus laevis* oocytes where mammalian protein assembly is sometimes problematic. Third, and finally, we introduced in the analysis the use of a fixed maturation rate specific to each expression system and double-binomial distributions in response to low GFP maturation rate and co-localization of single photobleaching spots, respectively. Interestingly, co-localization was not reported in prior work where the manual counting of photobleaching steps was performed on *Xenopus* oocytes. Whether this finding is unique to mammalian cells or has been neglected given the nature of the manual method will require further study.

### 4.5.1 Comparison with previous studies

Other step detection algorithms perform well for numerous applications (34). To evaluate how these other step detection algorithms performed for subunit counting compared to *PIF*, we applied the STEPFINDER algorithm (35) to simulated traces exhibiting variable SNRs in the absence of blinking. STEPFINDER is a chi-squared based algorithm originally developed to analyze the stepwise behavior of molecular motor displacements and was recently applied as a tool to analyze fluorescent subunit counting data (49). Despite STEPFINDER's proficiency as a tool for determining molecular motor displacements, the computed accuracy of *PIF* was significantly higher than STEPFINDER in particular at low SNR ( $< 4$ ; Supplemental Fig. S4.1 E). Like STEPFINDER, *PIF* could also be applied in the context of molecular motor displacements or similar experiments, especially since blinking

would not be an issue. Similarly, PIF could also analyze data derived from oocytes or even purified proteins (7,14,15,18).

Some previous studies deduced the number of subunits from the fluorescence intensity distribution of the individual spots rather than counting the number of photobleaching steps as in this study (8,16,17,50). Evaluation of the fluorescence intensities depends on relatively constant quantal intensity. Our data indicate, however, that a mean variation of 35% is typically observed in mammalian cells using fluorescent proteins. These variations may result from microenvironment changes (e.g. quencher concentration) (14,51), dipole orientation (42) and uneven excitation intensity over the field of view.

#### 4.5.2 *The challenges for future work on mammalian cells*

Although the ideal situation would be to study membrane-bound mammalian proteins in their native environment, this is difficult for a number of reasons. For example, the study of neurotransmitter receptors, as performed here, would be most relevant if performed in cultured neurons or acutely-isolated explant tissue where the normal clustering and assembly of neurotransmitter receptors are regulated by a variety of intrinsic and extrinsic factors (52,53). The successful execution of subunit counting using *PIF* would prove difficult under these conditions due to high protein densities which would make single-protein resolution unlikely. Given that *PIF* remains highly accurate over a wide range of SNRs, automated subunit counting analysis utilizing neurons may be possible, for example at extrasynaptic sites, provided receptor density is sufficiently low. An added complication however would be the formation of protein complexes between endogenous and recombinant protein subunits which would interfere with estimates of stoichiometry. This problem can only be overcome either by silencing the endogenous expression or by directly analyzing the endogenous proteins with *PIF* fluorescently tagging them with specific antibodies or toxins (11). In view of these difficulties, HEK293T cells were selected as the expression system in this study. Despite the challenge of background fluorescence resulting in low SNR, this cell line is used routinely in many laboratories. Most importantly, it shares a surprisingly similar mRNA expression profile with neurons (47) making it the cell of choice for subunit counting of neurotransmitter receptors.

A more tenable issue that may be resolved in the near future is to maximize the post-translational formation of the chromophore of GFP. In this study, we constructed a monomeric form of superfolder GFP (msfGFP) fused to the protein of interest since GFP dimerization would likely influence protein assembly (29,30). Compared to other GFP variants, the superfolder GFP has the advantages of superior folding efficiency and chromophore maturation properties at 37°C (30). In addition, it is also brighter thus increasing SNR in single molecule studies. Despite the enhanced folding and maturation, reported  $p_m$  values in *Xenopus* oocytes (75-80%) (7), are significantly greater than the values we obtained expressing msfGFP (53%) in mammalian cells. This is a critical factor to resolve in future work since maximizing  $p_m$  optimizes the confidence in the binomial fit of the photobleaching step distribution. Why maturation rates are lower in mammalian cells is still not clear though it is likely related to the higher temperature needed for mammalian cell culture which in turn affects the temperature-sensitive folding of GFP (27). Working at decreased temperature would only solve the problem to a limited extent as not only folding of GFP but possibly also folding, assembly and trafficking of the protein of interest would be affected. As we learn more about the structure of GFP and its variants, it may be possible to make mutations that allow the formation of the chromophore to be optimized for 37°C (27,28).

## 4.7 Conclusion

The last two decades has seen unprecedented advances in our understanding of a plethora of membrane-bound protein families in mammals; from their initial molecular identification by cloning to elucidation of their function with genetically-modified animals. Despite these advances, many basic properties of these proteins, such as subunit stoichiometry, remains poorly understood. Here, we have developed a reliable subunit counting method specifically for the study of proteins expressed in mammalian cells. The universality of this technique makes it possible to re-visit the widely anticipated role of subunit composition in fine tuning the response of individual cells and tissues to their external environment.

## 4.8 Acknowledgements

We wish to thank Elise Faure for stimulating discussions and comments on the manuscript.

## 4.9 Supplemental information

### 4.9.1 Step detection details of PIF

#### 4.9.1.1 Estimating noise

The basis of step detection by *PIF* rests on the ability to estimate the noise of a given trace in order to separate it from the bleaching steps. In brief, the noise is used as a “baseline” which a true step has to overcome in order to be recognized. In theory, the noise of a trace can be determined by calculating the difference between the parental raw trace and its idealization (noise free trace). The standard deviation of this resulting subtracted trace would reveal the global noise. However, it is impossible to obtain the idealized trace *a priori* because the idealized trace follows a baseline decreasing in discrete steps. Therefore, we estimated the noise using the standard deviation of the fluorescence fluctuations, as follows:

$$N_{FF} = \left( \frac{1}{T-1} \sum_{i=1}^{T-1} [\delta I - \bar{I}_{FF}]^2 \right)^{1/2} \quad \text{with} \quad \bar{I}_{FF} = \frac{I_T - I_1}{T-1} \quad (\text{eq. S4.1})$$

$$N_{FF} = \sqrt{\langle \delta I^2 \rangle - \langle \delta I \rangle^2} \quad (\text{eq. S4.2})$$

where  $I_i$  is the fluorescence intensity of the frame  $i$ ,  $\bar{I}_{FF}$  represents the mean value of fluorescence fluctuations  $\delta I = (I_{i+1} - I_i)$ ,  $N_{FF}$  is the noise from “fluorescence fluctuations” and  $T$  is the total number of frames within a recording. Since these fluctuations should represent the direct random nature of noise measured directly,  $\bar{I}_{FF}$  is  $\sim 0$ . However, photobleaching events contribute to  $\bar{I}_{FF}$  to a negative value. If  $k$  steps of height  $\Delta I$  occur,  $I_{FF} \approx -k \Delta I / (T-1)$ . This would be exactly the expected value for each fluctuation, were the decay continuously distributed over each sample point.

Although this calculation tends to overestimate the noise of a trace, the precise knowledge of the noise is not essential since step detection was optimized with reference to the definition of  $N_{FF}$  here. More precisely, the optimal step detection sensitivity  $\varphi$ , which represents the basis of the step detection algorithm (*see below*), was determined using simulated trace data where  $N_{FF}$  is controlled.  $\varphi$  is expressed as a function of the signal-to-noise ratio  $SNR$ , using the step amplitudes as the signal and  $N_{FF}$  as noise

#### 4.9.1.2 Progressive Step Detection

Although  $N_{FF}$  is initially known, we would also need the yet-unknown step amplitudes to evaluate the  $SNR$  of the trace. To circumvent this obstacle, the algorithm starts with a very small value for the  $SNR$  (user-defined parameter to  $\sim 0.25-1.0$ ) and thus for the  $signal = SNR \cdot N_{FF}$ . The step detection algorithm compares the current fluctuations to a threshold factor  $\sigma = signal / \varphi$ , where  $\varphi$  is defined as the step detection sensitivity  $\varphi$ .  $\varphi$  is an empirical calibration factor relating the step threshold  $\sigma$  to the current signal to noise ration  $SNR$ . The step detection sensitivity  $\varphi$  is well described by an exponential function that starts saturating for  $SNR > \sim 2.5$  (Supplemental Fig. S4.1 C). To keep the initial threshold  $\sigma$  small,  $SNR$  is set to a small and by association  $\varphi$  to a large value. Initially, the threshold is set to an even much smaller value  $\sigma_1 = \sigma/1000$  (*see Annealing phase* below).

The step detection algorithm itself progresses in an iterative manner and can be broken down into the three major steps described below (Supplemental Fig. S4.2).

1. SCANNING PHASE: The first data point is set as reference. Starting from here, the algorithm compares the intensity of each subsequent point to that of the reference. Three outcomes are possible; (i) If a point of larger intensity than the reference is found, all data points between the reference and this larger one are set to their average intensity; these points create one idealized “level” (Supplemental Fig. S4.2 A). Then the algorithm proceeds to the next data point, which is set as new reference and begins a new level. Subsequent points are compared to this new reference. (ii) If the value of any subsequent point is lower than the reference but their difference still smaller than the threshold ( $I_{reference} - I_i < \sigma_1$ ), the algorithm sets all points between the reference to the current one to their average intensity (Supplemental Fig. S4.2 B). The

reference obtains a new value, but the *same* level is continued with the next data point. (iii) Finally, if the intensity falls below the reference by more than the threshold, the previous level is ended. This lower point itself becomes the new reference and the following points are compared to it (Supplemental Fig. S4.2 C). The algorithm continues to the end of the trace and is then restarted with the idealized (“leveled”) data points with identical  $\sigma$ . This is repeated until the number of levels is no longer decreased (Supplemental Fig. S4.2 D and E).

2. ANNEALING PHASE: Once the idealization for a given threshold value no longer changes, the threshold is progressively increased ( $\sigma_1 \dots \sigma_{1000} = \sigma/1000, \sigma/999, \sigma/998, \dots, \text{to } \sigma$ ) and each time the scanning phase repeated on the previous idealization (Supplemental Fig. S4.2 F). Although one might think that the result should be similar to directly using the final value of  $\sigma$  defined through  $SNR$  and  $\varphi$ , it turned out that the accuracy was higher if the system was allowed to slowly anneal its final sensitivity.
3. REEVALUATION: Once the levels are no longer reduced even with the final value of  $\sigma$ , the new idealized values are used to re-compute  $N_{FF}$ . Now, also “signals”, step heights between levels, are available, so that  $SNR$  and  $\varphi$  can be re-evaluated. With these values and the current idealized data points, scanning and annealing phase are repeated on the previous idealization – again until levels are no longer reduced (Supplemental Fig. S4.2 G).

Initially, many small fluctuations are interpreted as steps (Supplemental Fig. S4.2 D, *left*). By association all three step amplitudes,  $SNR$  and  $\sigma$  remain small, too. With progressing idealization, the number of levels decreases and step amplitudes increase until finally only the “real” photobleaching steps overcome the threshold  $\sigma$ . The algorithm, however, does not actually aim to detect steps, but inversely scans for periods of constant intensity.

The slow progression reduces the probability of detecting variations in the trace due to noise or blinking events as photobleaching events. Also, the slow progression reduces the probability of missing low amplitude photobleaching events. Despite the algorithm’s iterative nature, final idealizations are generally obtained within fractions of a second using a modern

PC. The computing time decreases with increasing idealization as only differences between levels are evaluated and not each data point.

#### 4.9.2 Trace rejection

The step detection algorithm will attempt to find step-wise behaviour in any provided trace, even though that trace may not actually contain any steps. Therefore, after step detection, traces must be evaluated by a set of criteria as an estimate of trace quality. Five criteria were implemented into PIF for the evaluation of the step-wise behaviour: Thresholds for the maximal Chi-squared, for *SNR*, for the maximal time allowed for all fluorophores to bleach and for the maximal step amplitude.

- a. The Chi-squared ratio between the actual fit and a counter-fit for a given trace is a strong indicator of the step-wise behaviour. The counter-fit is computed as the average value between the centers of adjacent levels, as if the steps were located in the middle of two real consecutive steps (35). Small Chi-squared values are indicative of a better fit, and high values, such as those expected of a counter-fit, are indicative of poor fits. Consequently, a high ratio ( $> 1$ ) between chi-squared values of the counter-fit and of the actual fit generally correspond to traces exhibiting clear step-wise behaviour (35). Accordingly, a ratio  $< 1$  implies that the counter-fit is a better representation of the trace than the actual fit itself. Therefore, traces with a ratio  $< 1$  are excluded from analysis.
- b. Evaluating the quality of the fit for a given trace is achieved by calculating a Chi-squared value for the fit. The ability of PIF to fit a trace that does not exhibit clear step-wise behaviour (e.g. resulting from random fluorescence variations) is poor. In such cases, a goodness of fit ( $\chi^2_{fit}$ ) based on a Chi-squared calculation can be evaluated as follows:

$$\chi^2_{fit} = \sum_i \frac{(Exp_i - Ideal_i)^2}{var_i} \quad (\text{eq. S4.3})$$

where  $Exp_i$  and  $Ideal_i$  represent the data and the idealization at frame  $i$ , respectively. After idealization, the variance  $var$  is calculated for each intensity level

found. If the trace contains too many false detections or missed events,  $\chi^2_{fit}$  is expected to be smaller or larger than 1, respectively. False detections are generally not observed in our measurements because only the step-wise behaviour is fitted, not the blinking events or any imperfection within the trace. As a result, the threshold for rejection by the goodness of fit  $\chi^2_{fit}$  was empirically determined to be 1.5

- c. Simulation experiments established that the accuracy of step detection of PIF is significantly reduced in traces where the SNR is  $< \sim 2.5$  after applying C-K filtering (corresponding to  $\sim 0.85$  in the raw trace). Therefore, SNR was used as a rejection criterion where traces with SNRs  $< 2.5$  after filtering were discarded. This should not influence the resulting step distributions because the SNR is independent of the step number. In experimental data almost every trace had SNRs above 2.5 after applying the C-K filter (Supplemental Fig. S4.1 B).
- d. The fourth criterion is based on the time required to bleach  $n$  fluorophores, which is set using the lifetime of the fluorophores. To determine this lifetime, an exponential decay curve is fitted to the summed intensity of all selected spots within a region of interest. This decay leads directly to the probability fulfilled by any fluorophore that it has photobleached after excitation time  $t$ :

$$P_{bleach}(t) = (1 - e^{-t/\tau}) \quad (\text{eq. S4.4})$$

From this relation, one can compute the time required to have a probability  $P_{time}(n)$  of getting all  $n$  fluorophores photobleached:

$$P_{time}(n) = (1 - e^{-t/\tau})^n \quad (\text{eq. S4.5})$$

$$t = -\tau \cdot \ln(1 - P_{time}^{1/n}) \quad (\text{eq. S4.6})$$

The last relation can be used to determine the time when with a certain probability  $P_{time}$  all fluorophores have photobleached dependent on the number of steps detected. If a trace still shows steps after this allowed period of time, it is rejected. We found that setting  $P_{time}$  between 90% and 95% does not appear to reject clear traces, but mainly those where the exponential decay background was not successfully removed,



leading to detection of *false* steps typically towards the end of the traces. It also helps to reject contaminant spots, as they are often represented as “unclear” single photobleaching step traces with long duration.

- e. This single photobleaching event of the background fluorescence often exhibited an amplitude that was consistently significantly larger than steps attributed to the photobleaching of the fluorophores. These contaminants were removed by setting a rejection criterion based on the maximum allowable step amplitude. Traces showing step amplitudes greater than 2550 arb.u. ( $\sim 3$  times the amplitude of the average step size obtained from a step amplitude distribution) were rejected (Supplemental Fig. S4.3 E).

### 4.9.3 Calculating the probability of missed events

As missed photobleaching events could have an influence on the step frequency distribution (*see* Supplemental Fig. S4.3 B), here we show the derivation of the probability of missing a photobleaching event ( $P_{miss}(\Delta t)$ ) for a given time resolution  $\Delta t$ . As during  $\Delta t$  only a single step may be detected even though 2 or more occurred,  $P_{miss}$  is described by the probability that 2 or more photobleaching events occurred within the same interval  $\Delta t$ , while the other remaining fluorophores do not photobleach during this time interval. To evaluate this, the previously described probability  $P_{bleach}(t)$  is used as a starting point. This probability represents the cumulative probability distribution of the probability density function  $P_d(t)$  as follow:

$$P_d(t) = \frac{d}{dt} P_{bleach}(t) = \frac{e^{-t/\tau}}{\tau} \quad (\text{eq. S4.7})$$

$P_d(t)$  is useful to determine the probability that a fluorophore photobleaches during a given time interval by a simple integration. For instance, the integral of  $P_d(t)$  between 0 and  $t$  returns the relation  $P_{bleach}(t)$ , as it represents the probability of being photobleached after time  $t$ . Also, the integral from 0 to infinity results to 1, as the fluorophore will photobleach eventually. From this probability density, we estimate the probability of missing 1 photobleaching event by the multiplication of the probability that 2 fluorophores photobleach during the same time interval  $i$  [ $t_i, t_i + \Delta t$ ] and the probability that the other  $n-2$  remaining fluorophores do not

photobleach during this time interval, as shown in the equation S4.8. Finally, all time intervals  $i$  must be summed up to consider the whole trace. As fluorophores are not distinguishable, we have to consider their permutation as another multiplicative factor

$$\begin{aligned}
 P_{miss}^1(\tau, \Delta t) &= \sum_i \frac{n!}{2!(n-2)!} \left( \int_{t_i}^{t_i+\Delta t} \frac{e^{-t/\tau}}{\tau} dt \right)^2 \left( 1 - \int_{t_i}^{t_i+\Delta t} \frac{e^{-t/\tau}}{\tau} dt \right)^{n-2} \\
 &= \sum_i \frac{n!}{2!(n-2)!} \left( e^{-t_i/\tau} (1 - e^{-\Delta t/\tau}) \right)^2 \left( 1 - e^{-t_i/\tau} (1 - e^{-\Delta t/\tau}) \right)^{n-2}
 \end{aligned} \tag{eq. S4.8}$$

To calculate the probability of missing  $k-1$  events, the formula has to be adjusted in the following way:

$$P_{miss}^{k-1}(\tau, \Delta t) = \sum_i \frac{n!}{k!(n-k)!} \left( e^{-t_i/\tau} (1 - e^{-\Delta t/\tau}) \right)^k \left( 1 - e^{-t_i/\tau} (1 - e^{-\Delta t/\tau}) \right)^{n-k} \tag{eq. S4.9}$$

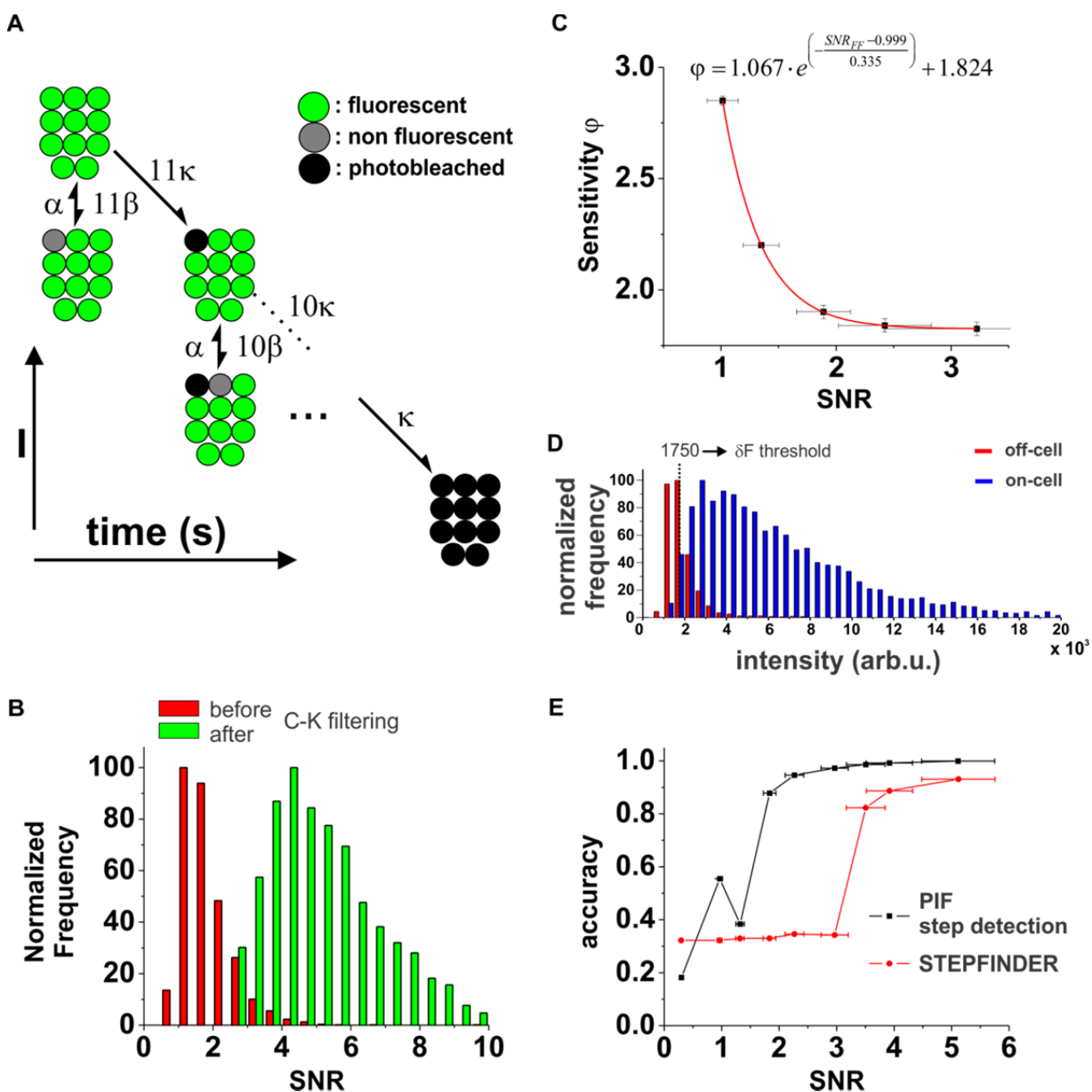
So, the probability of missing 1 or more photobleaching events is the sum of all the possibilities:

$$P_{miss}(\tau, \Delta t) = \sum_{k=2}^n \left( \sum_i \frac{n!}{k!(n-k)!} \left( e^{-t_i/\tau} (1 - e^{-\Delta t/\tau}) \right)^k \left( 1 - e^{-t_i/\tau} (1 - e^{-\Delta t/\tau}) \right)^{n-k} \right) \tag{eq. S4.10}$$

In typical experiments, the lifetime  $\tau$  is approximately 7 s and  $\Delta t = 150$  ms. For  $n = 5$  existing fluorophores, we then estimate  $P_{miss}$  to about 10.4%. If  $n = 4$  or  $n = 3$ ,  $P_{miss}$  is calculated to be about 6.3% and 3.2%, respectively.

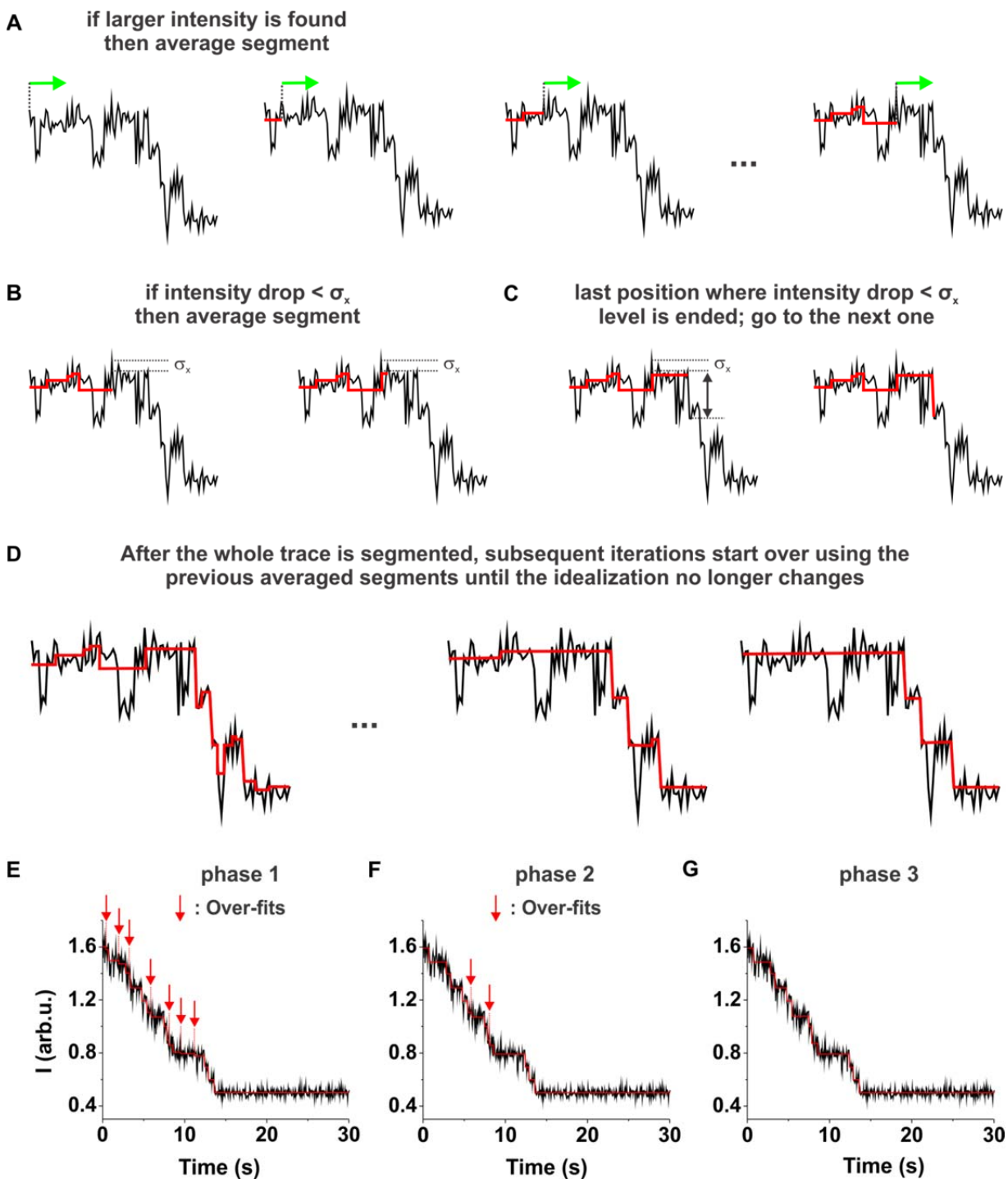
Simulations using  $\tau = 7$  s and  $\Delta t = 150$  ms were also done to estimate  $P_{miss}$ . 500 photobleaching traces were simulated 5 times for  $n = 5$ ,  $n = 4$  and  $n = 3$ . Each fluorophore was associated to a 2-state Markov model where the transition from the fluorescent state and the photobleached state occurs according to the rate constant  $1/\tau$ . Missed events were observed when 2 or more fluorophores photobleached within the same time resolution  $\Delta t$ . The results correspond nicely to the previous calculation. For  $n = 5$ ,  $n = 4$  and  $n = 3$ ,  $P_{miss}$  was obtained to be  $10.1 \pm 1.3\%$ ,  $6.4 \pm 0.8\%$  and  $2.8 \pm 1.1\%$ , respectively.

## 4.9.4 Supplemental figures

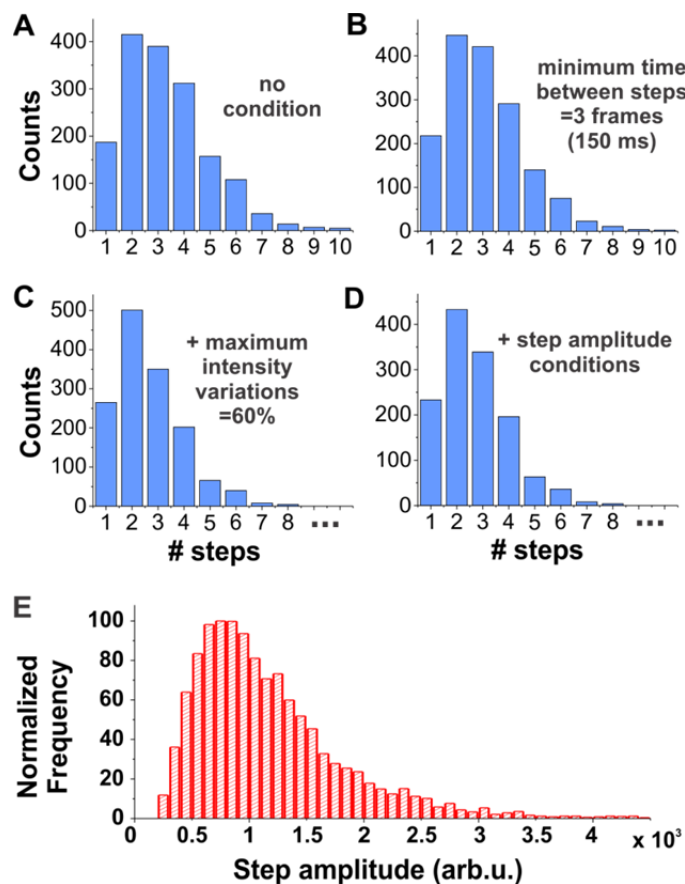


**Supplemental Figure S4.1** | (A) Illustration of the Markov model used to simulate photobleaching data. Only single transition blinking is allowed, described by the rate constants  $\alpha$  and  $\beta$ . These two parameters respectively define the transition of a fluorophore from a non-fluorescent to a fluorescent state, and vice versa. The last parameter, the rate constant  $\kappa$ , describes the transition of a fluorophore from a fluorescent state to its photobleaching and is therefore unidirectional. The model allows up to 11 fluorophores, but it is possible to start from a state where  $x$  ( $<11$ ) fluorophores are left (not photobleached) in order to simulate traces with different step number. (B) Effect of C-K filtering on the signal-to-noise ratio. Chung-Kennedy filter has the ability to increase the signal-to-noise ratio of a trace while keeping a

steep edge for relevant intensity variations. To evaluate the effect of C-K filtering on SNR, we used the fully-automated analysis of msfGFP-GluK2, as the SNR was computed with and without C-K filtering for the same idealization. The resulting distributions reveal a SNR increase by a factor of approximately  $3.0 \pm 0.5$ . (C) The sensitivity  $\varphi$  used in the step detection algorithm was optimized from simulations by choosing the value corresponding to the larger accuracy for a given  $SNR$ .  $\varphi$  was subsequently plotted as a function of  $SNR$  and fitted with a single exponential decay curve. The resulting exponential decay equation then became the calibration formula in the step detection algorithm. (D) Comparison of spots on-cell and off-cell and effect of LoG-type kernel filtering. Using a  $\delta F/F$  cut-off of 10%, the normalized intensity distributions on-cell (*blue*) and off-cell (*red*) are compared by calculating the average intensity of the spots over the first 100 frames (5 sec). From these distributions, the  $\delta F$  threshold was set to 1750 (arb.u.) for the actual system used. (E) The comparison in accuracy of PIF step detection and STEPFINDER is illustrated as a function of  $SNR$ . This evaluation was obtained using simulated traces containing 11 equidistant traces without blinking. Over the tested range of  $SNR$ , PIF reveals a larger accuracy than STEPFINDER. In the particular case of STEPFINDER, the accuracy was not precisely obtained for  $SNR$  lower than  $\sim 4$ , as the step distribution was very broad and accordingly very difficult to fit as previously described in “*Simulations: Calculation of  $p_{acc}$* ”. STEPFINDER detected step number was obtained by maximizing the ratio between the Chi-squared value of a counter-fit and the one corresponding to the fit (35).

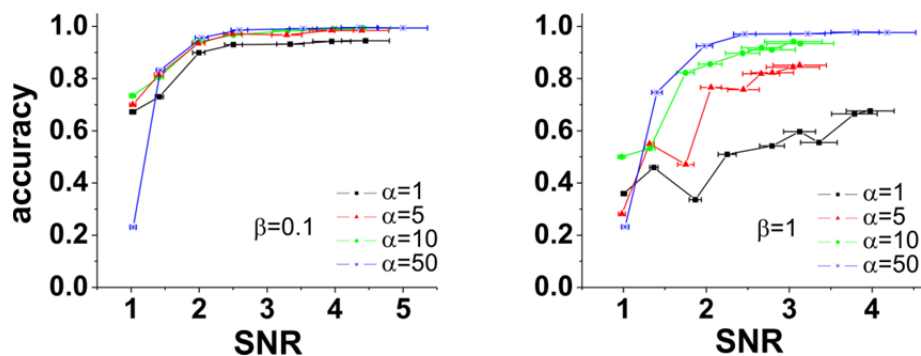


**Supplemental Figure S4.2** | PIF step detection algorithm described as conditions for segment averaging (see text for details). These conditions are iteratively repeated over averaged segments until convergence of the idealization. The progression of the algorithm can be divided into three main sections (phase 1,2,3), which are illustrated for a simulated trace containing 11 steps. Each algorithm section gradually removes the false detections within the trace.



**Supplemental Figure S4.3** | (A-D) Effect of step detection parameters on PIF automated analysis over GluK2. Step detection parameters were optimized by adding each parameter one at a time to the previous settings, as to check their influence on the overall step distribution. (A) Step distribution without using the parameters, except for the minimum time between steps which has to be set to 2 frames by default (see Step Detection). (B) The minimum time between steps is set to 3 frames (150 ms). This tends to decrease the number of false detections possibly due to C-K filtering and slight changes in the baseline, likely produced by an incomplete background removal (see Trace filtering in main text). This restriction does not significantly alter the probability of missing a step event, which remains below ~6% (see Calculating the Probability of Missed Events in supplementary experimental procedures). It is important to keep this value relatively small, as it could alter the final observed step distribution frequency by introducing a shift toward smaller values. Depending on each situation, larger probabilities of missing a step might complicate the interpretation of the results. (C) the maximal step amplitude variation is in addition set to 60%. As false steps were small in comparison to the maximal step size detected within a trace, setting the maximal amplitude variation to 60% of the largest step effectively removed these artifacts. This limit still tolerates variations in amplitudes due to blinking events and allows the possibility of two fluorophores photobleaching during one frame exposure. (D) According to the step size distribution (see E), the minimum step size amplitude of 375 (arb.u.) is added to the previous settings, while traces containing steps over 2550 (arb.u.) are rejected. We found that the most common step amplitude detected in all the traces is about 750-850 (arbitrary units specific to

our system, see E). Since excitation intensity remains uniform over the entire recorded field of view (maximum intensity variations of  $\sim 15\%$ ), we reasoned that it was unlikely to observe a fluorophore emitting less than half the intensity of the most commonly observed fluorescence intensity. Therefore, steps with intensities smaller than 375 (arb.u.) are attributed to artifacts of a decreasing baseline. Since concomitant multiple photobleaching steps are possible, though very infrequent, an upper step amplitude limit was also set as  $3 \times 850 = 2550$  (arb.u.). Traces containing steps outside this intensity range were rejected. (E) The step size distribution of detected steps was obtained from accepted traces of the distribution obtained in C.



**Supplemental Figure S4.4** | Effect of blinking on step detection accuracy. Sets of 500 simulated traces containing 4 photobleaching steps with different blinking properties were analyzed by PIF step detection algorithm for different SNRs. The accuracy curves using  $\alpha = 1$  (black squares), 5 (red triangles), 10 (green circles), 50 (blue stars) are illustrated for  $\beta = 0.1 \text{ s}^{-1}$  (left) and  $\beta = 1 \text{ s}^{-1}$  (right).

## 4.10 References

1. Schagger, H., Cramer, W. A., and von, J. G. (1994) Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.* 217, 220-230
2. Zheng, J., Trudeau, M. C., and Zagotta, W. N. (2002) Rod cyclic nucleotide-gated channels have a stoichiometry of three CNGA1 subunits and one CNGB1 subunit. *Neuron* 36, 891-896
3. Doyle, D. A., Cabral, J. M., 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  $\text{K}^+$  Conduction and Selectivity. *Science* 280, 69-77
4. Sobolevsky, A. I., Rosconi, M. P., and Gouaux, E. (2009) X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. *Nature* 462, 745-756
5. Barrera, N. P., Betts, J., You, H., Henderson, R. M., Martin, I. L., Dunn, S. M., and Edwardson, J. M. (2008) Atomic force microscopy reveals the stoichiometry and subunit arrangement of the  $\alpha 4\beta 3\delta$  GABA(A) receptor. *Mol Pharmacol.* 73, 960-967

6. Park, M., Kim, H. H., Kim, D., and Song, N. W. (2005) Counting the Number of Fluorophores Labeled in Biomolecules by Observing the Fluorescence-Intensity Transient of a Single Molecule. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 78, 1612-1618
7. Ulbrich, M. H. and Isacoff, E. Y. (2007) Subunit counting in membrane-bound proteins. *Nat. Methods* 4, 319-321
8. Godin, A. G., Costantino, S., Lorenzo, L. E., Swift, J. L., Sergeev, M., Ribeiro-da-Silva, A., De Koninck, Y., and Wiseman, P. W. (2011) Revealing protein oligomerization and densities in situ using spatial intensity distribution analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 7010-7015
9. Schmidt, T., Schütz, G. J., Gruber, H. J., and Schindler, H. (1996) Local Stoichiometries Determined by Counting Individual Molecules. *Anal. Chem.* 68, 4397-4401
10. Leake, M. C., Chandler, J. H., Wadhams, G. H., Bai, F., Berry, R. M., and Armitage, J. P. (2006) Stoichiometry and turnover in single, functioning membrane protein complexes. *Nature* 443, 355-358
11. Simonson, P. D., Deberg, H. A., Ge, P., Alexander, J. K., Jeyifous, O., Green, W. N., and Selvin, P. R. (2010) Counting bungarotoxin binding sites of nicotinic acetylcholine receptors in mammalian cells with high signal/noise ratios. *Biophys. J.* 99, L81-L83
12. Das, S. K., Darshi, M., Cheley, S., Wallace, M. I., and Bayley, H. (2007) Membrane Protein Stoichiometry Determined from the Step-Wise Photobleaching of Dye-Labelled Subunits. *ChemBioChem* 8, 994-999
13. Shu, D., Zhang, H., Jin, J., and Guo, P. (2007) Counting of six pRNAs of phi29 DNA-packaging motor with customized single-molecule dual-view system. *EMBO J* 26, 527-537
14. Blunck, R., McGuire, H., Hyde, H. C., and Bezanilla, F. (2008) Fluorescence detection of the movement of single KcsA subunits reveals cooperativity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 20263-20268
15. Groulx, N., McGuire, H., Laprade, R., Schwartz, J. L., and Blunck, R. (2011) Single molecule fluorescence study of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Aa reveals tetramerization. *J Biol Chem.* 286, 42274-42282
16. Kask, P., Palo, K., Ullmann, D., and Gall, K. (1999) Fluorescence-intensity distribution analysis and its application in biomolecular detection technology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 13756-13761
17. Chen, Y., Muller, J. D., So, P. T., and Gratton, E. (1999) The photon counting histogram in fluorescence fluctuation spectroscopy. *Biophys J* 77, 553-567
18. Reiner, A., Arant, R. J., and Isacoff, E. Y. (2012) Assembly Stoichiometry of the GluK2/GluK5 Kainate Receptor Complex. *Cell Rep.* 1, 234-240



19. Axelrod, D. (2001) Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology. *Traffic*. 2, 764-774
20. Sivilotti, L. G., McNeil, D. K., Lewis, T. M., Nassar, M. A., Schoepfer, R., and Colquhoun, D. (1997) Recombinant nicotinic receptors, expressed in *Xenopus* oocytes, do not resemble native rat sympathetic ganglion receptors in single-channel behaviour. *J. Physiol* 500 ( Pt 1), 123-138
21. Krashia, P., Moroni, M., Broadbent, S., Hofmann, G., Kracun, S., Beato, M., Groot-Kormelink, P. J., and Sivilotti, L. G. (2010) Human alpha3beta4 neuronal nicotinic receptors show different stoichiometry if they are expressed in *Xenopus* oocytes or mammalian HEK293 cells. *PLoS. One*. 5, e13611
22. Buller, A. L. and White, M. M. (1990) Functional acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes after injection of Torpedo beta, gamma, and delta subunit RNAs are a consequence of endogenous oocyte gene expression. *Mol. Pharmacol.* 37, 423-428
23. Schmidt, C. and Hollmann, M. (2008) Apparent homomeric NR1 currents observed in *Xenopus* oocytes are caused by an endogenous NR2 subunit. *J. Mol. Biol.* 376, 658-670
24. Hagiwara, S. and Jaffe, L. A. (1979) Electrical properties of egg cell membranes. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 8, 385-416
25. Dascal, N. (1987) The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels. *CRC Crit Rev. Biochem.* 22, 317-387
26. Schmidt, C., Klein, C., and Hollmann, M. (2009) *Xenopus laevis* oocytes endogenously express all subunits of the ionotropic glutamate receptor family. *J. Mol. Biol.* 390, 182-195
27. Siemering, K. R., Golbik, R., Sever, R., and Haseloff, J. (1996) Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. *Curr. Biol* 6, 1653-1663
28. Craggs, T. D. (2009) Green fluorescent protein: structure, folding and chromophore maturation. *Chem. Soc. Rev.* 38, 2865-2875
29. Zacharias, D. A., Violin, J. D., Newton, A. C., and Tsien, R. Y. (2002) Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science* 296, 913-916
30. Pedelacq, J. D., Cabantous, S., Tran, T., Terwilliger, T. C., and Waldo, G. S. (2006) Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 24, 79-88
31. Geiser, M., Cebe, R., Drewello, D., and Schmitz, R. (2001) Integration of PCR fragments at any specific site within cloning vectors without the use of restriction enzymes and DNA ligase. *Biotechniques* 31, 88-90, 92
32. Wallace, W., Schaefer, L. H., and Swedlow, J. R. (2001) A workingperson's guide to deconvolution in light microscopy. *Biotechniques* 31, 1076-8, 1080, 1082

33. Chung, S. H. and Kennedy, R. A. (1991) Forward-backward non-linear filtering technique for extracting small biological signals from noise. *Journal of Neuroscience Methods* 40, 71-86
34. Carter, B. C., Vershinin, M., and Gross, S. P. (2008) A Comparison of Step-Detection Methods: How Well Can You Do? *Biophysical Journal* 94, 306-319
35. Kerssemakers, J. W., Munteanu, E. L., Laan, L., Noetzel, T. L., Janson, M. E., and Dogterom, M. (2006) Assembly dynamics of microtubules at molecular resolution. *Nature* 442, 709-712
36. Qin, F., Auerbach, A., and Sachs, F. (2000) Hidden Markov modeling for single channel kinetics with filtering and correlated noise. *Biophys J* 79, 1928-1944
37. Qin, F., Auerbach, A., and Sachs, F. (2000) A direct optimization approach to hidden Markov modeling for single channel kinetics. *Biophys J* 79, 1915-1927
38. Axelrod, D., Burghardt, T. P., and Thompson, N. L. (1984) Total internal reflection fluorescence. *Annu. Rev. Biophys Bioeng.* 13, 247-268
39. Benson, R. C., Meyer, R. A., Zaruba, M. E., and McKhann, G. M. (1979) Cellular autofluorescence--is it due to flavins? *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 27, 44-48
40. Xiao, J. (2009) Single-Molecule Imaging in Live Cells. In Hinterdorfer, P. and Oijen, A. v., editors. *Handbook of Single-Molecule Biophysics*, Springer, New York
41. Terasaki, M., Runft, L. L., and Hand, A. R. (2001) Changes in organization of the endoplasmic reticulum during *Xenopus* oocyte maturation and activation. *Mol Biol Cell* 12, 1103-1116
42. Ding, H., Wong, P. T., Lee, E. L., Gafni, A., and Steel, D. G. (2009) Determination of the Oligomer Size of Amyloidogenic Protein Beta-Amyloid(1-40) by Single-Molecule Spectroscopy. *Biophysical Journal* 97, 912-921
43. Blunck, R., Starace, D. M., Correa, A. M., and Bezanilla, F. (2004) Detecting rearrangements of shaker and NaChBac in real-time with fluorescence spectroscopy in patch-clamped mammalian cells. *Biophys J* 86, 3966-3980
44. Dickson, R. M., Cubitt, A. B., Tsien, R. Y., and Moerner, W. E. (1997) On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein. *Nature* 388, 355-358
45. Pierce, D. W., Hom-Booher, N., and Vale, R. D. (1997) Imaging individual green fluorescent proteins. *Nature* 388, 338
46. Schmidt, C., Klein, C., and Hollmann, M. (2009) *Xenopus laevis* oocytes endogenously express all subunits of the ionotropic glutamate receptor family. *J. Mol. Biol.* 390, 182-195
47. Shaw, G., Morse, S., Ararat, M., and Graham, F. L. (2002) Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *The FASEB Journal* 16, 869-871

48. Garcia-Parajo, M. F., Koopman, M., van Dijk, E. M., Subramaniam, V., and van Hulst, N. F. (2001) The nature of fluorescence emission in the red fluorescent protein DsRed, revealed by single-molecule detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 14392-14397
49. Schuster, M., Lipowsky, R., Assmann, M. A., Lenz, P., and Steinberg, G. (2011) Transient binding of dynein controls bidirectional long-range motility of early endosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 3618-3623
50. Swift, J. L., Godin, A. G., Dore, K., Freland, L., Bouchard, N., Nimmo, C., Sergeev, M., De, K. Y., Wiseman, P. W., and Beaulieu, J. M. (2011) Quantification of receptor tyrosine kinase transactivation through direct dimerization and surface density measurements in single cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 108, 7016-7021
51. Blunck, R., Cordero-Morales, J. F., Cuello, L. G., Perozo, E., and Bezanilla, F. (2006) Detection of the Opening of the Bundle Crossing in KcsA with Fluorescence Lifetime Spectroscopy Reveals the Existence of Two Gates for Ion Conduction. *The Journal of General Physiology* 128, 569-581
52. Spitzer, N. C. (2012) Activity-dependent neurotransmitter respecification. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 94-106
53. Turrigiano, G. G. (2008) The self-tuning neuron: synaptic scaling of excitatory synapses. *Cell* 135, 422-435



## *Chapitre 5*

# **Studying clustering of KcsA channels using single-channel voltage-clamp fluorescence imaging**

Hugo McGuire<sup>a,b,1</sup> and Rikard Blunck<sup>a,b,c,2</sup>

<sup>a</sup>Groupe d'Étude des Protéines Membranaires (GÉPROM), Departments of <sup>b</sup>Physics and <sup>c</sup>Physiology, Université de Montréal, Montréal, QC, H3C 3J7

Submitted to *Nature Communications*

**Key words:** planar lipid bilayer; lateral diffusion; ion channels clustering; single-particle tracking; hydrophobic mismatch

---

This work was supported by operating grants from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada

<sup>1</sup> Recipient of a Fonds de Recherche du Québec-Nature et Technologies fellowship.

<sup>2</sup> Recipient of Canada Research Chair award on Molecular Mechanisms of Membrane Proteins. To whom correspondence should be addressed: Dépt. de Physique, C.P. 6128 Succ. Centre-ville, Université de Montréal, Montréal, Quebec H3C 3J7, Canada.

## **Contribution des auteurs**

Dans le cadre de cette étude, j'ai pris les mesures et analysé les résultats. J'ai également développé un programme informatique pour suivre l'intensité de canaux diffusant dans une bicouche lipidique planaire et pour corriger l'intensité selon le bruit de fond local. J'ai aussi écrit la première version de l'article. Finalement, ma contribution s'inscrit globalement au design de la recherche.

Rikard Blunck a proposé l'étude sur l'oligomérisation de canaux. Il a aussi contribué globalement au design de la recherche et a également édité l'article.

## 5.1 Summary

Oligomerization and complex formation play a key role for many membrane proteins. Oligomerization, or clustering, has also been described for ion channels and might influence ion channel function. In this study, we observed clustering of single KcsA (E71A) channels in planar lipid bilayer using single molecule fluorescence, while simultaneously measuring single channel currents. Clustering coincided with cooperative opening of KcsA. Clustering was not caused by direct protein-protein interactions but was mediated via microdomains induced by the channel itself in the lipid matrix. We found that single channel activity of KcsA occurs in conically shaped lipids in the lamellar liquid crystalline ( $L_\alpha$ ) phase, and it seems that deformations in the membrane due to the need for a negative curvature and not the hydrophobic thickness are responsible for clustering. The method introduced here, will be applicable to follow oligomerization of a wide range of membrane protein.

## 5.2 Introduction

Oligomerization is a key event in the physiological function of a number of membrane proteins including signal transduction receptors (1-5) or pore forming toxins (6-8). Similarly, complex formation is a prerequisite for various signaling and transport events triggered by signaling complexes and secretion systems (9,10). “Integral” ion channels, in contrast, are not generally thought to require oligomerization or “clustering” after their assembly in the golgi/ER for their physiological function, but some are known to recruit auxiliary subunits. Nevertheless, clustering has been suggested to modify the function of several ion channels or pore forming toxins (11-14), including the prokaryotic proton-gated ion channel KcsA (15,16).

Oligomerization has been studied previously using different techniques including fluorescence resonance energy transfer (FRET) and single molecule fluorescence (3,5,6,8,17). However, in the present study, we went one step further and directly observed the dynamics of the oligomerization process on the single molecule level and correlated it with functional data. To this end, we performed single molecule voltage-clamp fluorometry imaging, where we

follow the diffusion and oligomerization of single fluorescently-labeled KcsA channels while simultaneously recording the function via electrophysiology.

We chose to work in a planar lipid bilayer system, as here, we gain control over the lipid composition of the surrounding membrane. This was important, as lipid composition has been suggested to influence both ion channel function and clustering. Previous studies suggested modulation of channel activity as a function of several physical properties of the bilayer such as its fluidity, free volume, stiffness and the intrinsic lipid curvature (18,19). Notably, another important modulator for channel activity is the electrostatic charge of the surrounding lipids. One well studied example of ion channel regulation by charged lipid are the highly-anionic phosphatidylinositols that gate inward rectifying potassium ( $K_{IR}$ ) and ATP-dependent potassium channels ( $K_{ATP}$ ) (20-22). The proton-gated KcsA potassium channel has been suggested to require anionic lipids for opening (23,24), whereas voltage-gated potassium channels decrease and increase their open probability in the presence of anionic and cationic lipids, respectively (25-28).

Also the hydrophobic thickness of the lipid bilayer has been suggested to affect the function of ion channels (29-35). Changes in the thickness alter both the conductance and open probability of BK channels (31,33), as well as the water permeability of aquaporin-4 channels, the primary water channel in the mammalian brain (30). Similarly, the activation energy for the mechanosensitive MscL channels was lowered when reducing bilayer thickness (32). KcsA increases its open probability with decreasing chain length (34).

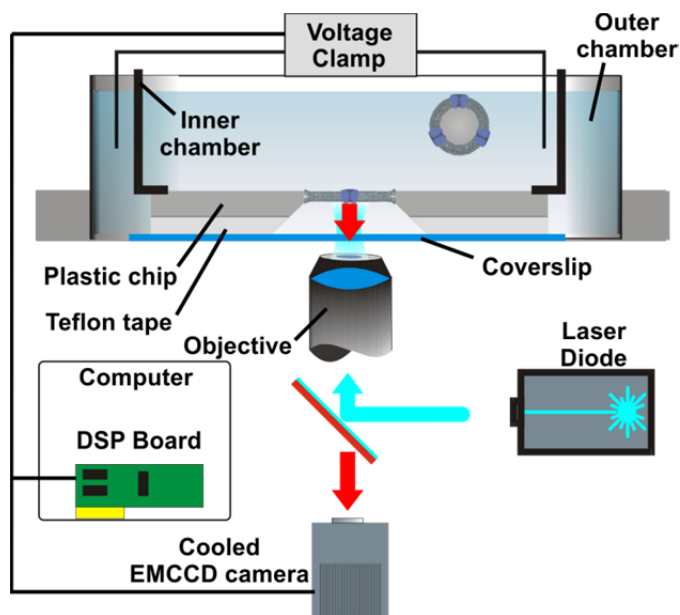
The modulation of the channel activity by bilayer thickness can be explained by a hydrophobic mismatch between the lipid matrix and the membrane proteins. Although protein-lipid interaction is often quantitatively described assuming that membrane proteins remain rigid while the acyl chains of the lipids adjust their length (36-38), this is strictly true only for rigid proteins, such as  $\beta$ -helical gramicidin channels (39) or  $\beta$ -barrel protein OmpF (40). These have been shown to induce prominent distortion of the lipid environment (35,41,42). But, vice versa, also the protein will rearrange to match the hydrophobic surface with the hydrophobic thickness of the bilayer in order to circumvent the high energy cost of exposing hydrophobic regions to the polar interface. This may be done (i) by preferring the state with the resulting lower free energy according to a Boltzmann distribution or (ii) by repacking or tilting of



secondary structures of a given state. Accordingly,  $\alpha$ -helical membrane proteins were found to be more adaptable and to distort the bilayers less (35,41,42).

However, any distortion that does occur might not only have functional consequences but may also cause clustering. While the most straightforward explanation for clustering would be direct protein-protein interaction, clustering can also be caused by a mismatch of the hydrophobic surface with the hydrophobic core of the membrane or the membrane curvature induced by the protein. In the latter cases, a “microdomain” around the protein would be distorted with respect to the bulk bilayer, and fusion of these domains, which would be energetically more favorable, would lead to channel clustering (36,43-47). This prediction is supported by studies of aggregation of transmembrane proteins (45,48,49).

Since the lipid-mediated effects discussed above possibly co-exist and modulate ion channel function there is an increasing interest in measuring channel activity under simultaneous control of several possible mediators. In this study, we investigated the effect of both bilayer thickness and lipid headgroup properties on KcsA (E71A mutant) behavior and oligomerization, by simultaneously tracking single channel function and position (Fig. 5.1).



**Figure 5.1** | Illustration of the single-channel voltage-clamp fluorescence imaging setup. The planar lipid bilayer is formed within an aperture of a thin plastic chip (150-250  $\mu\text{m}$ ). Solutions are allowed to flow on both sides of the membrane with a teflon spacer between chip and

coverslip. To minimize the distance between the objective and the bilayer, a coverlip of only 80  $\mu\text{m}$  thick is separating the outer chamber from the optical system. This configuration permits the use of a high numerical objective ( $>1.4$ ) together with the use of a standard voltage-clamp setup. Moreover, the channels are completely free of surface interactions, in contrast to supported bilayers where the channels are in close proximity to the supporting surface. The fluorescence and ionic current are simultaneously measured as described in the text.

## 5.3 Experimental procedures

### 5.3.1 *KcsA purification, labeling and reconstitution in lipid vesicles*

If not stated otherwise, chemicals were obtained from Sigma-Aldrich. We used the KcsA mutant E71A since this mutation removes both the inactivation occurring at the selectivity filter (C-type inactivation) and the slight voltage dependence of KcsA (50,51). KcsA was expressed and purified from *Escherichia coli* strain M15 transformed with a N-terminally (His6)-tagged KcsA-E71A-H124C-pQE32 vector as described previously(52), with slight modifications. Cells were first grown overnight in 10 ml LB media supplemented with 100  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin and 25  $\mu\text{g/ml}$  Kanamycin. This preparation was then added to 1L LB media supplemented with 100  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin and grown for about 2.5 hours until  $\text{OD}_{600} \sim 0.6$ . For induction of KcsA expression, the culture was supplemented with 5% glycerol and 5 mM isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) and kept at 25°C for about 4 hours. Cells were harvested and homogenized on ice in a previously cooled sodium-phosphate based buffer ( $\text{NaP}_{\text{KCl,NaCl}}$ : 100mM NaCl, 50mM KCl, 50mM phosphate buffer containing about 45mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  and 5mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.5) supplemented with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) prior to lysis using an EmulsiFlex-C5. Membranes were isolated by ultracentrifugation at 150,000 g for 1 hour and then solubilized in 2% n-Dodecyl  $\beta$ -D-maltoside (DDM) for 2 hours at 4°C. The sample was centrifuged at 100,000 g for 30 min to remove unsolubilized fractions.

Purification of the channel was accomplished by Cobalt affinity chromatography (Talon superflow, Clontech) on an ÄKTA purifier (GE Healthcare, life sciences) using 0.02% DDM and 40 mM imidazole in  $\text{NaP}_{\text{KCl,NaCl}}$  buffer supplemented with 5% glycerol. Prior to elution at 400 mM imidazole, the cysteines were reduced by continuous flow ( $\sim 1.5$  ml/min) of

1mM Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP-HCl, Pierce) for 10 column volumes. The channels were labeled overnight at 4°C with >5x molar excess of either AlexaFluor-488-C<sub>5</sub>-maleimide, AlexaFluor-594-C<sub>5</sub>-maleimide or AlexaFluor-647-C<sub>2</sub>-maleimide. Unreacted dyes were removed by a second purification on the cobalt affinity column.

The channels were reconstituted in lipid vesicles of either DPhPC, POPE:POPG (3:1), di(14:1)-PC, di(16:1)-PC, di(18:1)-PC, di(18:1)-PC: di(18:1)-PG (3:1), di(20:1)-PC, or di(22:1)-PC (Avanti Polar Lipids). All phospholipid mixture were solubilized in chloroform, dried and resuspended in High-K buffer (450mM KCl, 10mM Hepes, pH 7.4) at 10 mg/ml. Lipid-containing solutions were sonicated until transparency, indicating formation of small unilamellar vesicles. Proteins were added at a 1:100 protein-to-lipid mass ratio, resulting in a channel concentration of about 1.3  $\mu$ M. Detergent was removed using a D-Tube Dialyzer Mini (Novagen) with a molecular weight cut-off of 12-14 kDa. Samples were dialyzed for at least 3 days in the High-K buffer, changing the solution every 6-12 hours. Subsequently, they were aliquoted, flushed with nitrogen and kept either at 4°C up to 3 months or at -80°C for long term storage.

### 5.3.2 *Supported bilayers*

Experiments with supported bilayers were accomplished as described previously (6,52). Briefly, glass coverslips (Fisherfinest Premium Cover Glass 25x25 – 1, Fisher Scientific) were cleaned by several 30 minute sonication steps at 50°C in Alconox and anhydrous ethanol. Coverslips were rinsed in milli-Q water between each sonication step. Clean coverslips were then glued to an external chamber as support for the bilayers. The chamber was filled with a solution containing 100 mM KCl, 10 mM Hepes and 1 mM CaCl<sub>2</sub> (pH 4). Before injecting KcsA proteoliposomes, KcsA reconstituted in vesicles of DPhPC were diluted 167-fold, from 1.3  $\mu$ M to about 9.8 nM in vesicles of the desired composition at 2.5 mg/ml. 3  $\mu$ l of this preparation was mixed to a chamber containing 400  $\mu$ L and allowed to reach the coverslip for about 30 minutes before washing the excess vesicles. Fluorescence recordings of single channels labeled with AlexaFluor-594-C<sub>5</sub>-maleimide were done using an inverted microscope (Axiovert 200, Zeiss) with a high numerical aperture objective (Plan-

Apochromat 40X/N.A. = 1.3, Zeiss), an EMCCD camera (iXon<sup>+</sup> 860BV, Andor Technology) and a 532 nm laser diode (World Star Tech) exciting the dyes at 500  $\mu$ W.

Analysis of single subunit counting data and the intensity of each fluorescent spot prior to photobleaching was obtained using *PIF* (53), a software for single-subunit counting analysis.

### 5.3.3 *Voltage-clamp fluorescence imaging recordings of single KcsA channels*

Voltage-clamp recording was combined with a fluorescence microscope described above to allow simultaneous observation of current and fluorescence of the KcsA channels (Fig. 5.1). To allow optical access to the lipid bilayer, a cylindrical shaped chamber (outer chamber) carrying a round glass coverslip (thickness #0: 0.08 mm; VWR international) over its bottom side was placed on top the sample holder. A smaller cylindrical chamber (inner chamber) holding a < 80  $\mu$ m thick acetal film (McMaster-Carr) underneath was placed inside the first chamber. The film contained a 150-250  $\mu$ m-diameter aperture, in which the bilayer was formed. Solution containing 100 mM KCl, 10 mM Hepes and 1mM CaCl<sub>2</sub> (pH 4) was added to both chambers before the formation of the lipid bilayer in the hole. Prior to all lipid bilayer experiments, a drop of decane-solubilized lipids was placed on the rim of the aperture and dried exposed to air. The planar lipid bilayer was formed according to the “painted bilayer technique” by applying either decane or hexadecane solubilized phospholipids at a concentration of 25 mg/ml over the hole using a glass rod. A membrane potential of 100 mV was applied in order to detect ion conduction. Channels were added to the lipid bilayer by injecting about 0.15-0.25  $\mu$ L of KcsA reconstituted in lipid vesicles (0.1 mg/ml) in the inner chamber. Once channel activity was detected, excess vesicles were removed from the inner chamber by washing 5-10 times. The system was connected to an Axopatch 200A amplifier and externally controlled using GPatchM software. The time-resolved fluorescence imaging was acquired simultaneously by the EMCCD camera triggered from GPatchM. The labeled channels were fluorescently excited by a 500  $\mu$ W-laser beam with a wavelength of either 488 nm, 532 nm or 635 nm. Emitted light was filtered by a bandpass filter (525/50, 605/70 or 705/80, Chroma Technologies) combined with a dichroic mirror (405/488/561/635 nm lasers

BrightLine quad-edge laser-flat, Semrock, or z532, Chroma Technologies). Exposure time for recordings was set to 200 ms.

#### 5.3.4 Tracking of single-channel diffusing in a lipid bilayer

The channels incorporated in the lipid bilayer were freely laterally diffusing. Single bright spots corresponding to either clustered channels or single-channels could be tracked using an in-house program written in Matlab (Mathworks). The lateral diffusion coefficient  $D$  was calculated from the slope ( $D = \text{slope}/4$ ) of the mean square displacement  $\langle r^2 \rangle$  as a function of time  $t$  using channel trajectories:

$$\langle r^2 \rangle = 4Dt \quad (\text{eq. 5.1})$$

The intensity value of each spot was tracked over time and was used to evaluate the presence and number of single or clustered channels. The background of a spot was removed at each frame by fitting the spot to a 2-D Gaussian and subtracting the calculated baseline.

#### 5.3.5 Determining FRET efficiency and evaluating distances between single FRET pairs

To determine the FRET efficiency  $E$  and the corresponding distance  $r$  between a donor and an acceptor, we first evaluated the FRET intensity by exciting the donor and measuring the intensity of the acceptor. Here, we used the AlexaFluor-488-C<sub>5</sub>-maleimide for the donor and AlexaFluor-647-C<sub>2</sub>-maleimide for the acceptor. A leak of the donor emission could be directly detected when measuring FRET using the acceptor bandpass filter. Also, the acceptor could be slightly excited by the light used to excite the donor, resulting in a leak of the acceptor emission. We therefore corrected for these possible situations using the following equation.

$$FRET = I_{488-705/80}^{DA} - I_{488-525/50}^{DA} \cdot leakDonor - I_{635-705/80}^{DA} \cdot leakAcceptor \quad (\text{eq. 5.2})$$

$I_{y-z}^x$  is the intensity of  $x$  while exciting at  $y$  nm after filtering with the  $z$  filter.  $x$  could be the donor alone ( $D$ ), the acceptor alone ( $A$ ), or the donor-acceptor pair ( $DA$ ).  $y$  is either 488 or 635, depending if exciting the donor or the acceptor, respectively.  $z$  represents the filter used.

For the donor or acceptor fluorescence, the bandpass filter 525/50 or 705/80 was used, respectively, in combination with the multi-edge dichroic beamsplitter (405/488/561/635).  $leakDonor$  and  $leakAcceptor$  were both evaluated before the FRET experiments using either the donor or the acceptor alone. They can be represented by the following equations.

$$leakDonor = \frac{I_{488-705/80}^D}{I_{488-525/50}^D} \quad (\text{eq. 5.3})$$

$$leakAcceptor = \frac{I_{488-705/80}^A}{I_{635-705/80}^A} \quad (\text{eq. 5.4})$$

In respect of our experimental conditions and using always the same laser intensities, we found  $leakDonor=0.011\pm 0.003$  and  $leakAcceptor=0.08\pm 0.02$  (mean  $\pm$  stddev). From equations (5.2), (5.3) and (5.4)  $E$  and  $r$  can be evaluated by using these equations.

$$E = \frac{FRET / (QY_A \cdot CorrFiltA)}{FRET / (QY_A \cdot CorrFiltA) + I_{488-525/50M}^{DA} / (QY_D \cdot CorrFiltD)} \quad (\text{eq. 5.5})$$

$$r = R_0 \left( \frac{1-E}{E} \right)^{1/6} \quad (\text{eq. 5.6})$$

Here,  $QY_D=0.92$  and  $QY_A=0.33$  are the quantum yields of the donor and the acceptor, respectively, as provided by the manufacturer (life technologies). Since only a fraction of either the donor or the acceptor spectra was collected, a correction factor for the filters was added.  $CorrFiltD=0.66$  and  $CorrFiltA=0.49$  are the fraction of the light collected over the spectra of either the donor or the acceptor, respectively.  $R_0=56 \text{ \AA}$  is the distance between the FRET pair for which the FRET efficiency is  $E=50\%$ , as provided by the manufacturer (Life Technologies).

## 5.4 Results

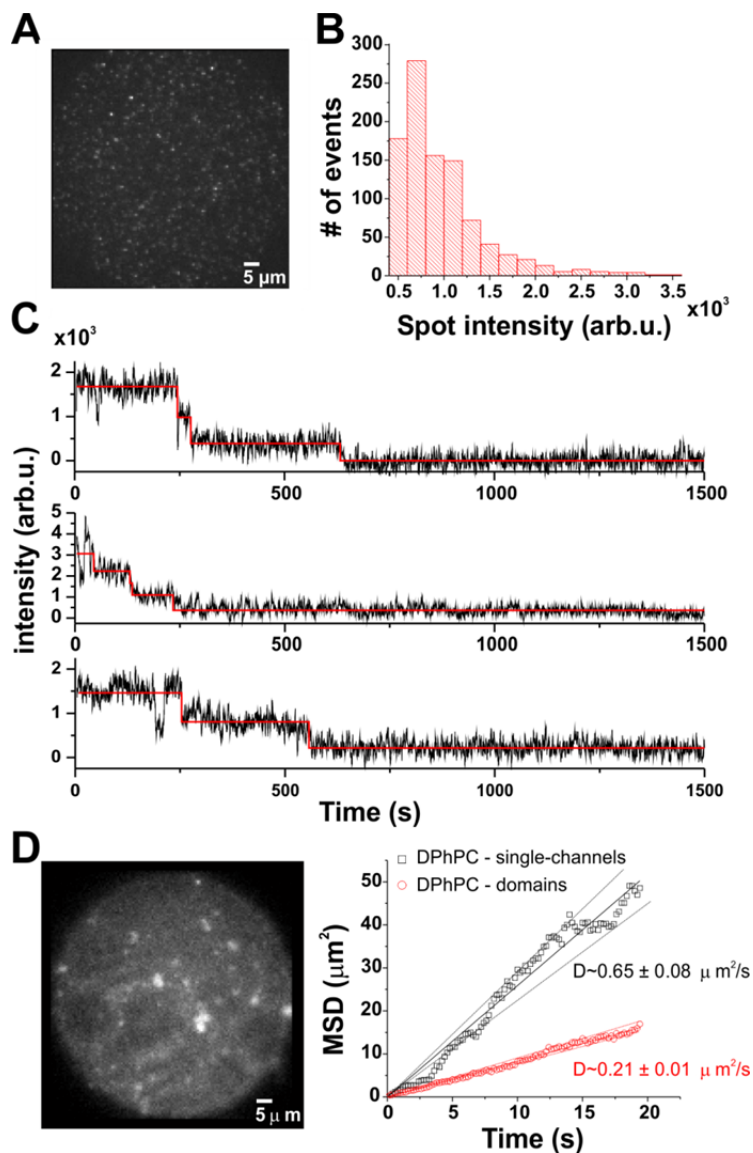
### 5.4.1 Calibration of single channel fluorescence intensities

Before tracking single channel oligomerization, we first had to establish what constitutes a single channel and multiple channels in terms of fluorescence intensity. We therefore calibrated the fluorescence intensity originating from a single channel in DPhPC

(1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) supported lipid bilayer as described previously (52) (Fig. 5.2 A-C). The advantage of supported lipid bilayers is that channels are prevented from diffusing in the bilayer and thus from clustering. We attached a thiol-reactive fluorescent probe at position H124C in the KcsA-E71A background and determined the distribution of spot intensities for the entire field of view at the observation excitation intensity of 500  $\mu$ W. We then increased the intensity to 850  $\mu$ W and determined for each spot the number of fluorophores using single subunit counting (53) (Fig. 5.2 C). Spots were classified as single channels if its fluorescence decayed in 1-4 bleaching steps. Intensity values in the range between 500-3500 arb.u. was found to be characteristic for a single channel (Fig. 5.2 B).

#### 5.4.2 *Channel diffusion and direct observation of single-channel clustering in planar lipid bilayers*

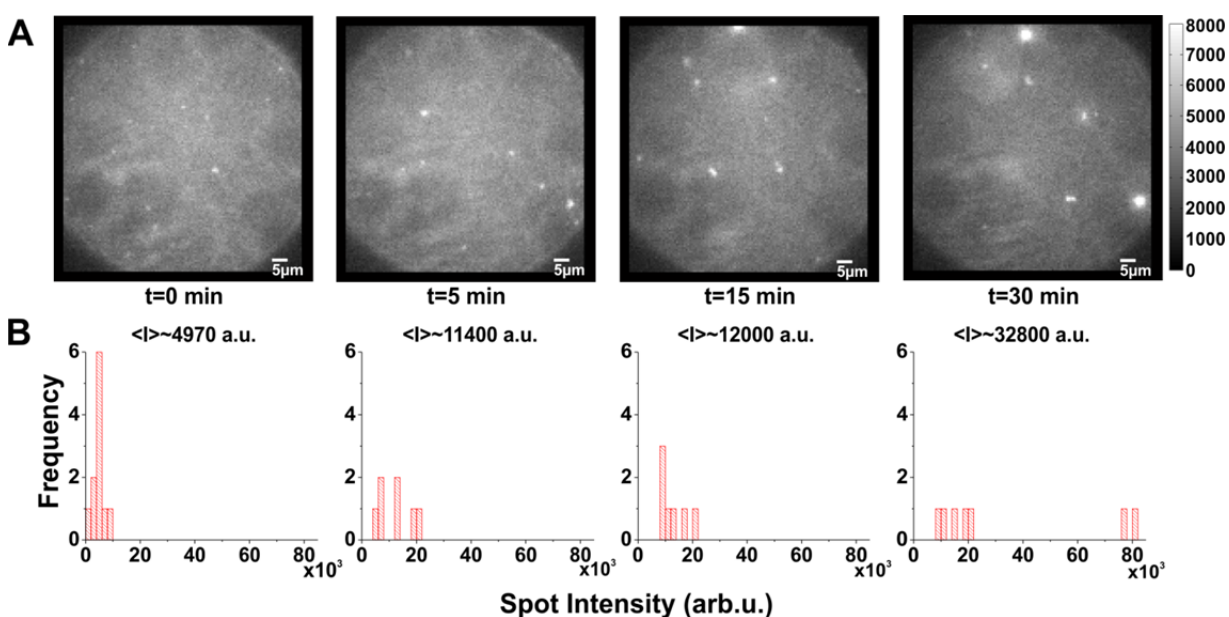
With this calibration, we next aimed to track the single channels in a lipid membrane where they are free to diffuse. We formed planar lipid bilayers according to the black lipid method (54). The bilayers were formed in a small aperture in polymer chips that place the bilayer within the working distance of a high numerical aperture objective (55,56). We tracked the single channels by imaging the fluorescence of the bilayer with an EMCCD camera while simultaneously recording the electrical activity (Fig. 5.1). In order to keep the channel in a mainly activated-open state, the proton concentration on both sides of the lipid bilayer was adjusted to pH 4 (51,57-59). The high open probability  $p_o$  simplified the assessment of channel activity. Channels were fused to bilayers composed of DPhPC or a lipid mixture of 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine and 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol), POPE:POPG (3:1 w:w) in decane. The mutation H124C together with the dye did not seem to affect normal KcsA activity at pH 4 (Supplemental Fig. S5.1). The open probability of the channel was close to one in both lipid compositions as expected for a functional KcsA-E71A at pH 4.



**Figure 5.2** | Fluorescence on supported bilayers versus planar lipid bilayer. (A) Single KcsA-E71A channels in DPhPC supported bilayers. (B) The normalized frequency distribution of spot intensities shows a single-channel fluorescence peak ranging from  $\sim 500$ - $3500$  arb.u.. Spots were selected only if they showed 1-4 photobleaching steps, as detected by automated analysis software(53). (C) Example of KcsA channels in planar lipid bilayer (DPhPC/decane). (D) The mean squared displacement (MSD) as a function of time to illustrate the diffusion of KcsA channels in planar lipid bilayer. The analysis was separated in two groups, since low intensity single-spots, constituting single-channels, appear to diffuse faster than larger fluorescent domains as expected for Brownian diffusion. The average diffusion constant evaluated from the slopes is  $0.65 \pm 0.08$  for single-channels and  $0.21 \pm 0.01$  for larger domains ( $N=148$ ). The errors were estimated according to the confidence levels shown as dashed lines.



In the fluorescence signal, we observed, in addition to the single spots, highly fluorescent “spots” or areas with an apparent size of a few microns that seemed to contain a larger number of channels (Fig. 5.2 D). These highly fluorescent areas increased in number and intensity over time (Fig. 5.3 A), suggesting that they represent clusters of KcsA channels that slowly agglomerate. We quantified this by determining the temporal development of the spot intensity of the bilayers. When plotting the spot intensity distribution of a single bilayer over time, one can follow the agglomeration of channels in fewer but more intense spots (Fig. 5.3 A). After about 10-30 minutes, most channels were part of clusters. Accordingly, the average intensity of the spots had increased 6-7-fold from 4970 a.u. to 32800 a.u. (Fig. 5.3 B).



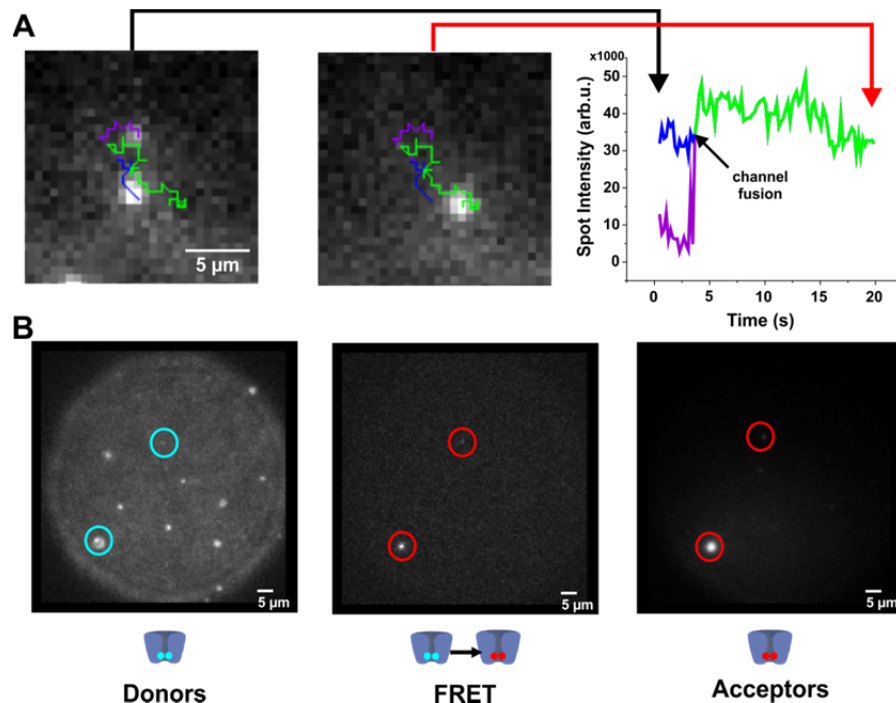
**Figure 5.3** | Temporal evolution of KcsA clustering. (A) images taken from a DPhPC/decane bilayer in which labeled KcsA channels were fused show that clustering appears more and more prominent over time. (B) the corresponding spot intensity distribution confirms a shift towards clustered spots, although some could remain individual. Excitation light was restricted to the central area of the bilayer in order to prevent scattering from the torus and the chamber.

#### 5.4.3 Tracking Diffusion and Clustering of single KcsA channels

By directly tracking the position of single spots, we were also able to characterize the diffusion behavior of single channels and higher oligomers (Fig. 5.2 E). In DPhPC, lateral diffusion coefficients of  $0.65 \pm 0.08$  and  $0.21 \pm 0.01 \mu\text{m}^2/\text{s}$  were obtained for single channels

and clusters, respectively. Although the clusters were not of uniform size and the diffusion coefficient thus represents an average, clearly, the clusters diffused significantly slower than the single channels due to their larger radius.

If the single channels clustered over a period of 30 minutes, we should be able to directly observe fusion between two single channels. We therefore tracked the diffusion of single channels in close proximity to one another until fusion was observed (Fig. 5.4 A and Supplemental movie 5.1). The fusion process showed some peculiarities; channels were not associating every time they got into close proximity ( $\sim 1 \mu\text{m}$ ). Instead, they often appeared to nearly collide, but then repulsed each other and remained within their own “territory” as if a barrier was separating them (see Supplemental movie 5.2). However, shortly before a dimerization event, their movement became directed relative to each other, as if an attracting “long-range” interaction ( $1.2\text{-}2.5 \mu\text{m}$ ) occurred. After fusion, the fluorescence intensity of the “dimer” spot equaled the sum of the intensities of the two original spots, indicating that indeed both proteins diffused collectively in the newly formed “cluster” (Fig. 5.4 B).



**Figure 5.4** | Direct observation of KcsA clustering. (A) By tracking the fluorescence of individual spots, their interaction has been assessed. Although the channels often experienced repulsion as they seemed to closely collide, it was also possible to observe what seems to be a

“long-range” interaction of a few micrometers (1.2-2.5  $\mu\text{m}$ ) before they assemble together. When that happens, the channels remain in close contact and the total intensity corresponds to the sum of the individual spots. (B) *FRET occurs between co-localized channels*. KcsA channels were labeled either with AlexaFluor-488-C<sub>5</sub>-maleimide (donor) or AlexaFluor-647-C<sub>2</sub>-maleimide (acceptor). As the  $R_0$  of this fluorescent pair is about 56 Å, we could evaluate the proximity from about 35 Å to 85 Å. Both populations were injected one after the other on the planar lipid bilayer. After a few minutes, co-localized donor-acceptor pair was observed (*left and right panels*), as well as a low FRET signal (*middle panel*), indicating channel proximity of about 60 Å (N=33). Our results suggest therefore that direct protein-protein interactions do not occur, although they assemble in closely packed microdomains.

#### 5.4.4 *Single-pair FRET of KcsA clusters reveals a distance of about 60 Å separating the channels*

The “long-range” attraction between the channels suggests that the microenvironment around the channel influences clustering. However, once in close proximity, they could also directly interact via protein-protein interaction. From our observations, we can deduce that the two channels enter within the radius of a diffraction limited spot ( $\sim 380$  nm) preventing us from distinguishing two spots. To further reduce the upper limit for the distance between two channels, we performed Förster Resonance Energy Transfer (FRET) measurements. We simultaneously fused DPhPC liposomes containing channels labeled with either AlexaFluor-488-C<sub>5</sub>-maleimide or AlexaFluor-647-C<sub>2</sub>-maleimide ( $R_0 = 56$  Å) to the lipid bilayer and performed FRET measurements by exciting the donor (at 488 nm) and imaging the acceptor emission (705 nm/40 nm ; sensitized emission).

Soon after vesicle fusion to the lipid bilayer, spots containing both donor- and acceptor-labeled channels were observed and gave rise to sensitized emission. Over time, with increasing number of channels, more and more spots developed a sensitized emission signal (Fig. 5.4 B). The mean energy transfer efficiency was  $E = 0.11 \pm 0.08$  (mean $\pm$ stddev). Such an energy transfer corresponds to a distance between two channels of approximately  $d \sim 60$  Å if we calculate the apparent energy transfer between two KcsA channels with a closest distance  $d$  and fully labeled at position H124C (for details see Supplemental Fig. S5.3). This approximation only considers two channels, as a higher number of channels would result in too many geometric combinations. However, we did not observe higher energy transfer for those spots containing just two channels compared to the larger spots, indicating that the

multiple geometric arrangements had no influence on energy transfer efficiency. We also analyzed the energy transfer efficiency for each single spot so that unpaired channels or clusters containing only donors or only acceptors did not influence the transfer efficiency. The relatively large distance of 60 Å between neighboring channels suggests that no direct protein-protein interaction occurred although they are confined to microdomains smaller than 400 nm.

#### 5.4.5 Channel clustering occurs for various bilayer thickness values

Both the apparent distance between two clustered KcsA channels and the long-range interaction of about 1-2 μm indicate that clustering is promoted by an interaction with the environment and not a direct protein-protein interaction. One possible explanation would be a mismatch between the hydrophobic surface of the channels and the thickness of the bilayer (36,43-45,48,49). It is difficult to estimate what should be the “native” hydrophobic thickness for KcsA. According to the full length crystal structures (60,61) the hydrophobic thickness<sup>3</sup> would be 34 Å and 33 Å for the open and closed state, respectively. However, the membrane of *Streptomyces lividans*, the actinobacteria from which KcsA was originally obtained, contains mainly branched-chain saturated C14, C15 and C16 iso-acids and C15 anteiso-acids (62). Their thickness should be close to DPhPCs, which is also a C16 lipid with branched hydrocarbon chains. DPhPC’s hydrophobic thickness at T = 20°C is 27.8 Å (63). In a binding assay (35), C22-PC, corresponding to a thickness of 37 Å, was previously shown to display the highest affinity.

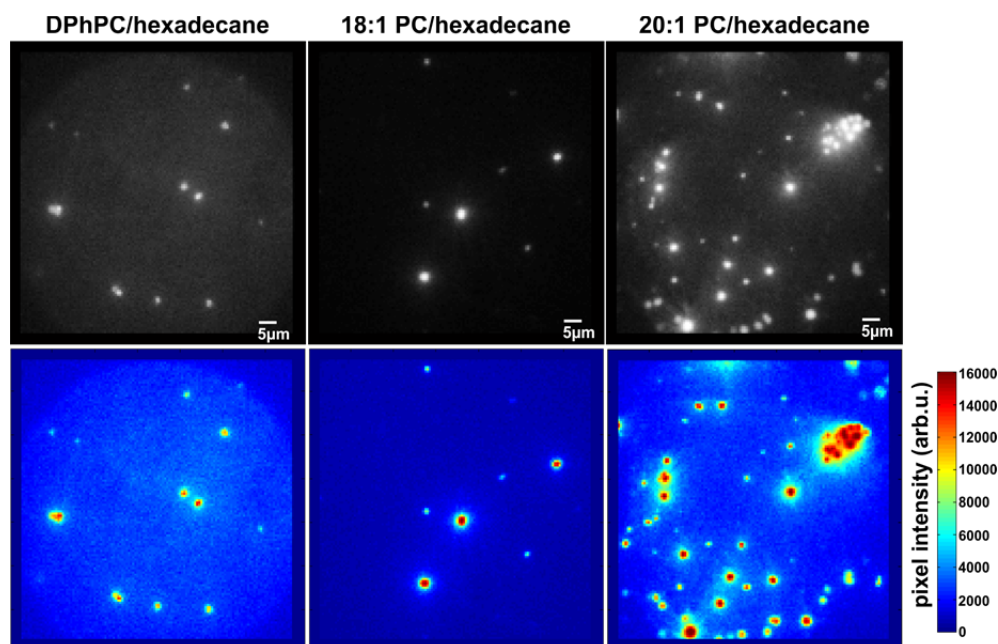
We observed clustering at different thicknesses. Hydrophobic thickness of solvent-free bilayers can be estimated to be  $1.75(n-1)$  Å, where  $n$  is the number of carbons in the acyl chain (64). We tested different phosphocholines (PC) with acyl chain lengths between 14:1 and 22:1 in decane. As the lipids of reconstitution might have a significant effect on channel behaviour (28), we reconstituted the channels directly in lipids of the same composition as the bilayer during the experiments. For all conditions, we observed very similar clustering behaviour (Fig. 5.5 and Supplemental Fig. S5.2).

---

<sup>3</sup> Measured from Trp 87 to Trp 113.

However, in a painted lipid bilayer, the experimental thickness of the DPhPC/decane bilayer was previously estimated to be 44 Å (65). This is higher than pure DPhPC due to residual solvent in painted bilayers. The bilayer hydrophobic thicknesses tested would cover between 44 Å and 58 Å (66) and are therefore longer than any of the above approximations for the native thickness. Clustering of KcsA in DPhPC/decane bilayers might thus be favored by the experimental conditions. To reduce the effect of the solvent on membrane thickness, we evaluated clustering in bilayers formed with hexadecane as the solvent. Hexadecane increases the bilayer thickness less than decane. For DPhPC, hexadecane would increase the bilayer thickness by about 10 %, leading to a hydrophobic thickness of about 30 Å (65). The shortest acyls chains di(14:1)-di(16:1)-PC did not yield stable bilayers. For the other chain lengths, switching the solvent to hexadecane did not alter clustering behaviour (Fig. 5.5).

The fact that no significant difference in clustering was observed under all experimental conditions (30-58 Å) indicated that hydrophobic mismatch is not the main driving force for clustering. One possible explanation might be that the channels adapt to the different hydrophobic thicknesses.



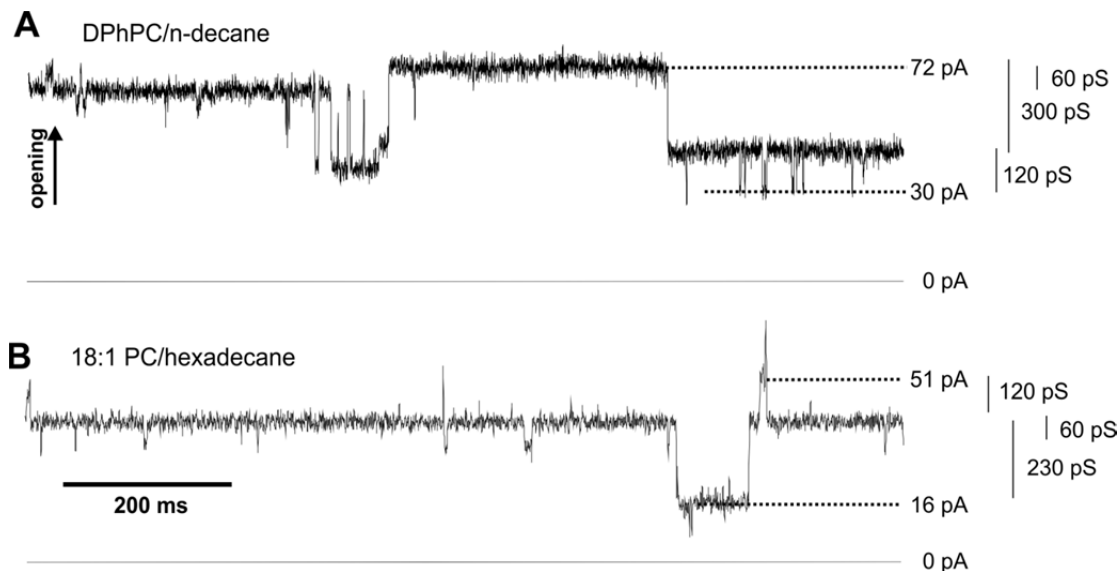
**Figure 5.5** | KcsA clustering is observed for various thickness conditions. Images taken from DPhPC/hexadecane bilayers (*left*, N=10), 18:1 PC/hexadecane bilayers (*middle*, N=10) and 20:1 PC/hexadecane bilayers (*right*, N=4). While changing the solvent between n-decane and

hexadecane and varying the acyl chain length of the lipid bilayer, changes in bilayer thickness are expected. Since clustering was observed for all tested conditions, from about 30 Å to about 58 Å, it appears that hydrophobic mismatch does not occur or does not influence importantly KcsA clustering in our experiments.

#### 5.4.6 *Relation between bilayer thickness on channel clustering and channel activity*

It had been suggested earlier that clustering influences KcsA function (15). In order to characterize the effect of different lipid compositions on ion channel function and its relation to clustering, we imaged channels in the bilayer while simultaneously recording the ionic current passing through it. We first investigated the single channel behaviour in different lipid compositions at low channel density. KcsA-E71A-H124C in a 3:1 (w:w) ratio of di(18:1)-PC:di(18:1)-PG as well as di(22:1)-PC:di(18:1)-PG showed the same high open probability as in DPhPC or POPE:POPG (3:1). There was also no significant difference in the pH dependence of DPhPC and di(22:1)-PC:di(18:1)-PG compared to POPE/POPG (3:1) (58) (Supplemental Fig. S5.1).

In DPhPC/decane and di(18:1)-PC/PG/decane bilayers (Fig. 5.6 A), we observed, in addition to the normal single channel activity, cooperative gating events with conductances multiple to the single channel conductance. However, it was difficult to distinguish this activity from single channel gating observed simultaneously. The reason was that we had to work at high channel density in order to investigate the effect of clustering on channel activity. We therefore suppressed single channel activity by removing the anionic PG in di(18:1)-PC, making use of the observation that single KcsA channels do not open in pure PC bilayers (23,24). We found that cooperative openings still occurred even in the absence of anionic lipids. In the di(18:1)-PC/hexadecane bilayers (32 Å (66)), the channels underwent frequent cooperative openings (Fig. 5.6 B). As observed in the presence of PG, the conductance values were multiples of the single channel conductance (5-13 times; Fig. 5.6 B) and were often initiated by a 500-1000 pS step. Most importantly, the cooperative openings only occurred if, at the same time, clusters were observed optically (Supplemental Fig. S5.4). The strong correlation between the occurrence of clusters and cooperative gating suggested that channel opening is coupled in the clusters.



**Figure 5.6** | Coupled KcsA gating involving several channels. Cooperative activity involving several channels was observed in the presence of clusters in bilayers formed of (A) DPhPC/decane ( $N = 3$ ) and (B) di(18:1)-PC/hexadecane ( $N = 18$ ).

An alternative explanation would be that the high conductance passes not through coupled KcsA pores but through unspecific pores formed by clusters – i.e. pores in-between channels arising from the geometric rearrangement of the channels or even disturbance of the bilayer integrity. We verified that the current passes through the classic pores by exchanging  $K^+$  with  $Ba^{2+}$  while keeping the osmolarity constant. In the presence of 66 mM  $BaCl_2$ , the pores of both, single channel current in DPhPC/decane bilayers as well as the cooperative openings in 18:1-PC/hexadecane were blocked ( $N = 3$ ).

#### 5.4.7 *KcsA activity is determined by lipid phases*

Our above results indicate that cooperative opening of KcsA not only coincides with clustering of the KcsA channels but occurs even in lipid compositions that prevented single KcsA channels from opening such as pure DOPC (di(18:1)-PC) bilayers. This will help us elucidate which parameter is responsible for the clustering. If we consider opening of KcsA in terms of the free energy of the system, then removing the anionic lipid DOPG from the DOPC/DOPG mixture shifts the equilibrium from the open to the closed state (Fig. 5.7 A). Under these conditions, the rate limiting step for opening is governed by the lipid environment. This rate limiting step is overcome by clustering, allowing (cooperative) opening

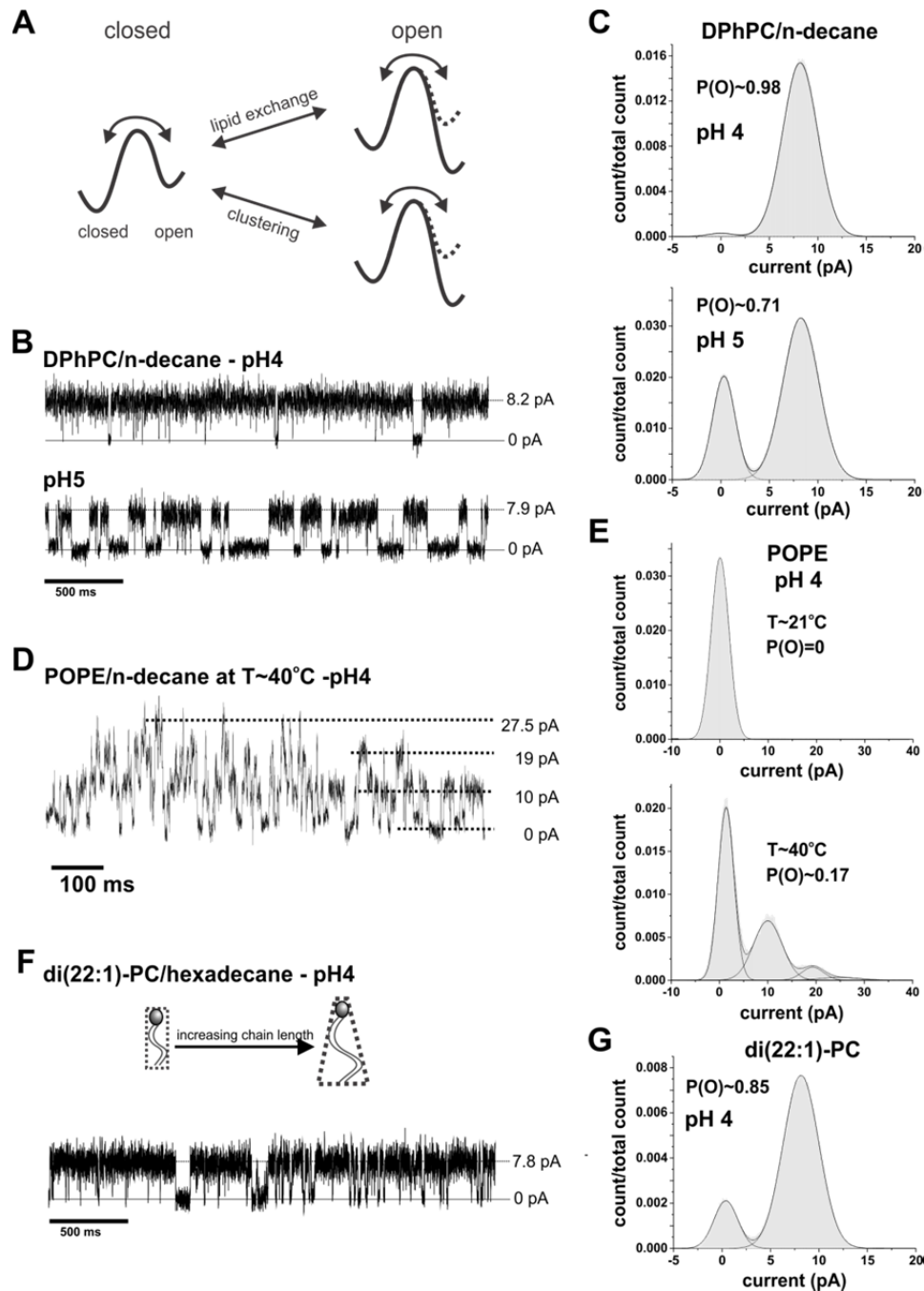
of KcsA under identical conditions, i.e. even in DOPC. This suggests that the same physicochemical parameter of the lipid environment which limits KcsA single channel activity is also responsible for clustering (Fig. 5.7 A). It will therefore be instructive to more closely examine which parameter determines the lipid dependence of single KcsA activity.

<b>Lipids</b>	<b>Phase (20°C)</b>	<b>shape</b>	<b>Activity</b>
POPE	L $\beta$	conical	No
POPE:POPG 3:1	L $\alpha$	conical	Yes
DPhPC	L $\alpha$	conical	Yes
POPC	L $\alpha$	cylindrical	No <sup>58</sup>

**Table 5.1:** Summary of physicochemical parameters and KcsA activity for different lipid compositions.

We already examined the hydrophobic thickness above, and established that bilayers of different thicknesses significantly altered neither clustering (Fig. 5.5) nor single channel activity (Supplemental Fig. S5.1). We next analyzed which lipid compositions allowed or prevented single channel activity (Table 1). It is known that single KcsA channels are not active in pure POPE but require POPG to be added in order to gate (23,24). POPG is negatively charged, and it was previously thought that negative charges are essential for KcsA gating (23,24). While the mechanism was uncertain, it was suspected to be related to the local proton concentration or a direct interaction with positively charged residues stabilizing the open state as suggested by Iwamoto and Oiki (59). However, we and others (52,67) observed that also in the absence of negatively charged lipids but in the presence of branched acyl chains in DPhPC, the single channels gate normally with an open probability close to 1 (Fig. 5.7 B,C). It seems that the branched acyl chains of DPhPC are able to stabilize the open state of KcsA similar to POPG. Although we do not exclude that anionic lipids also have a positive effect on KcsA opening, anionic lipids are not required.





**Figure 5.7** | Lipid dependence of single channel activity. (A) Effect of lipid composition and clustering on the energy barrier for KcsA opening. While in a DOPC:DOPG mixture KcsA is active, i.e. the free energy is minimal in the open state, they become inactive in pure DOPC and the free energy is minimal in the closed state. The opening is thus limited by the lipid composition. This limitation is overcome by clustering; clustered channel again have minimal energy for the (cooperative) open state. (B) Representative current traces of single channel activity of KcsA in pure DPhPC bilayers at pH 4 & 5 ( $N > 25$ ). (C) Amplitude histograms of traces shown in *b*. The open probability was found to be close to 1 at pH 4. (D) An example of

a current recording of KcsA in pure POPE/decane at high temperature ( $T \sim 40^\circ\text{C}$ ) is shown. (E) Current amplitude histograms of KcsA channels in pure POPE at room temperature ( $T \sim 21^\circ\text{C}$ , *top*) and after heating up the system to  $40^\circ\text{C}$  (*bottom*). The open probability increased from 0 to  $\sim 0.17$  with increasing temperature ( $N = 4$ ). (F) Example of a current trace of KcsA in di(22:1)-PC/hexadecane ( $N=3$ ). (G) Amplitude histogram of the recording shown in *f*.

We next considered which other parameter of POPE is altered by addition of POPG. POPE has an acyl chain melting temperature  $T_m$  (lamellar gel  $L_\beta$  to lamellar liquid crystalline phase  $L_\alpha$ ) of  $25^\circ\text{C}$ , which is above the experimental temperature ( $21^\circ\text{C}$ ).  $T_m$  is lowered in the presence of 25% POPG to  $20\text{-}22^\circ\text{C}$  (68), suggesting that a lipid matrix in the  $L_\alpha$  phase might be required for channel opening. However, KcsA is inactive in pure POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) bilayers (59) although POPC, similar to POPG, has a chain melting temperature of  $T_m = -2^\circ\text{C}$ . So, while the  $L_\beta$  phase seems to prevent gating, a lower phase transition temperature alone is not sufficient to allow KcsA gating.

POPG also has a smaller headgroup than POPC and thus a more conical shape. The conical shape favors deformations in the membrane, as they have a higher propensity to form inverted structures (negative spontaneous curvature). Consistently, also DPhPC has a negative spontaneous curvature (69,70). But again, the conical shape of the lipids alone cannot be responsible for the channel activity as no activity is observed in pure POPE bilayers, despite the fact that POPE has a strong negative spontaneous curvature. We therefore hypothesize that channel activity of KcsA requires both lipids above their chain melting temperature and with conical shape.

We tested this hypothesis by incorporating KcsA channels in pure POPE bilayers and increasing the temperature above the chain melting temperature  $T_m$ . Consistent with our hypothesis, KcsA channels became active at temperatures above  $T_m$  (Fig. 5.7 D,E).

We further corroborated the need for conically-shaped lipids by testing phosphatidylcholine with a longer chain length since the conical shape of lipids increases with the length of the acyl chains (71). In di(22:1)-PC/hexadecane, we found KcsA activity with an open probability  $P(O) \sim 0.85$  (Fig. 5.7 F,G). However, at this chain length, activity was only observed in 33% of successful bilayer formation. The finding is additionally supported by a previous study showing that cardiolipin, a strong inducer of negative curvature, in a 1:3

mixture with POPE increased KcsA activity ~3-fold compared to POPG in spite of having the identical charge density (23). In summary, these results confirm that lipids in the  $L_{\alpha}$  phase and negative spontaneous curvature facilitate KcsA activity.

It is not surprising that chain melting leads to higher activity, as the channel will require less energy to accommodate the open state in the lipid membrane. Why is a conical shape important? KcsA opens by widening the helical bundle crossing. Conically shaped lipids will lower the lateral pressure at the helical bundle thus assisting pore opening.

The lipid dependence of KcsA gating and clustering may be applicable to a wider range of ion channels. For instance, a combination of a negative headgroup charge and a conical shape was suggested to be essential for BK channel gating (72, 73).

## 5.5 Discussion

In this work, we studied the clustering of KcsA by imaging single channels in a planar lipid bilayer while simultaneously recording the ionic current. We found clustering to occur at all hydrophobic thicknesses that were tried (30-58 Å). Prior to clustering of the channels, we observed a directed movement between them, indicating that a long-range interaction initiates clustering. Our FRET measurements confirmed that the channels, although close, still uphold a mean distance around 60 Å, which is consistent with recent measurements using atomic force microscopy (30-140 Å at pH 4) (16). Consequently, KcsA channels do not directly interact with each other but congregate within a small region.

Clustering coincided with cooperative gating of the channels. For the channels to open cooperatively, however, they have to “communicate” with each other, which seemingly contradicted the long-range interaction observed by imaging. Hence, the channels communicate indirectly with each other, raising the question as to how this indirect interaction is mediated? The distances were too large for direct protein-protein contact, and the Debye length in solution was too short for electrostatic interactions. The remaining possibility would be that channels interact via the lipid matrix. According to our observations, they induce microdomains in the surrounding lipid matrix, which repel each other until an energy barrier is overcome allowing fusion of two domains (Supplemental movie 5.1 and 5.2). The fusion is

observed as the long-range directed movement of the channels. This gives us an estimate of the maximum size of these domains of  $\sim 1\text{-}2\ \mu\text{m}$ . Deformations of similar size are caused by the viral M protein in GUVs, which also cluster in the membrane (74).

So, what can we say about the nature of the lipid-mediated interaction? Mechanical deformation, or bending, of the membrane has been suggested to reach this scale (75), and KcsA with its conical shape is predestined to induce a curvature in the membrane. However, since we cannot directly detect deformations in the membrane, we will consider how the lipids affect the function of KcsA channels. Our results suggest that single KcsA channels require conically shaped lipids in the lamellar liquid crystal phase to open because more cylindrically shaped lipids (e.g. DOPC) or lipids in the  $L_{\beta}$  phase (e.g. POPE) limit single channel activity. One possible explanation for the elevated energy cost for opening in the absence of conically shaped lipids would be higher lateral pressure on the helical bundle crossing. The helical bundle crossing of KcsA has to widen to open the pore thus pushing against the headgroups of the surrounding lipids. In conically-shaped lipids, the lateral pressure on the headgroups seems to be lower compared to the hydrophobic core.

Now then, we established that lipids influence the ion channel state and, vice versa, that the channel is influencing the lipid matrix surrounding it. The energy required for the mechanical deformation or hindrance to open will act in both directions such that both processes are likely based on the same parameter; in other words, they are the two outcomes of the same interaction.

In pure POPC (59) or DOPC, the effect of the lipids on the KcsA channel is rate limiting for opening. This limitation is overcome in clusters, where the channels can open cooperatively. The additional energy to enter the open state is thus provided by the fusion of the microdomains surrounding the KcsA channels. Vice versa, again, clustering is energetically more favorable, because more proteins stabilize the structure of the microdomain once fused.

So why do we observe cooperative opening in clusters? It is likely that the cooperative openings occur because once the channels in the clusters require less energy to induce the negative curvature in the surrounding – because shared – the additional energy is

sufficient to open cooperatively. While the proteins stabilize their own domain, the energy cost for opening a single channel is still too high. Only if two (or more) channels open simultaneously does the system reach a state with a total free energy which is favorable with respect to the closed states. The induced negative curvature of a channel attempting to open seems to be transferred to the neighboring channel, triggering its opening. It appears that the same parameter controls single channel activity, clustering and cooperative opening of KcsA, namely the negative membrane curvature.

An effect complementary to clustering due to the induced microdomains is observed in the use of lipid cubic phases for crystallization of membrane proteins (76). Here, clustering and even aggregation of membrane proteins is mediated by the different phases of the lipids. The strong curvature of the cubic phases “pushes” the proteins together in a region flattened by the presence of an aggregate.

Membrane deformations induced by proteins is an essential part of budding in endocytosis and bacterial or viral attack. Budding requires a membrane region with negative curvature. Most proteins inducing budding anneal to the membrane in one leaflet, but also integral membrane proteins may induce such deformations, and KcsA, with its conical shape, is predisposed to do so. The proteins would be embedded within such a deformation (47). Clustering of the proteins inducing the deformation would be a direct consequence.

In this work, we presented simultaneous single channel fluorescence and current data that allowed us to characterize in detail channel clustering and its effect on channel activity in real time. The results will likely find a widespread application on a variety of membrane proteins, in particular for proteins, for which oligomerization is an essential part of their physiological function. While ion channels are not generally thought to belong to this class, they often recruit auxiliary subunits. Also, when high expression leads to surface “crowding”, ion channels may interact with each other. For instance, Kaluin et al., (14) suggested that large conductance from antibiotic syringomycin E channels was a result of clustered channels gating cooperatively. Similarly, Grage et al. (12) proposed a coupled-gating mechanism for MscL channels, and, in the voltage-gated prokaryotic potassium channel KvAP, relatively high fluctuations in macroscopic currents are observed that exceeds normal “shot noise” (27,28,77). This increased noise indicates a cooperative operation of the channels and possibly clustering.

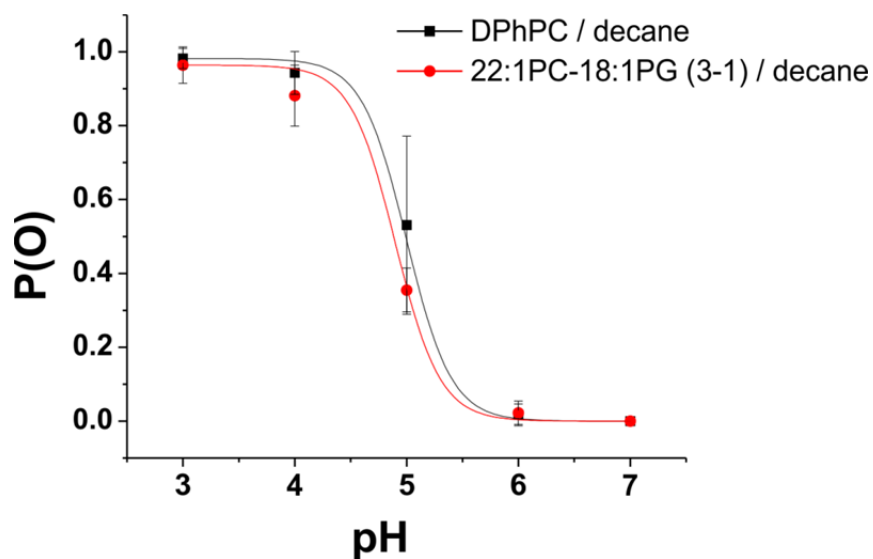
Clustering therefore seems essential not only for bacterial toxins or scaffolding proteins, but may be a general property of many integral membrane proteins with significant impact on protein function.

## 5.6 Acknowledgements

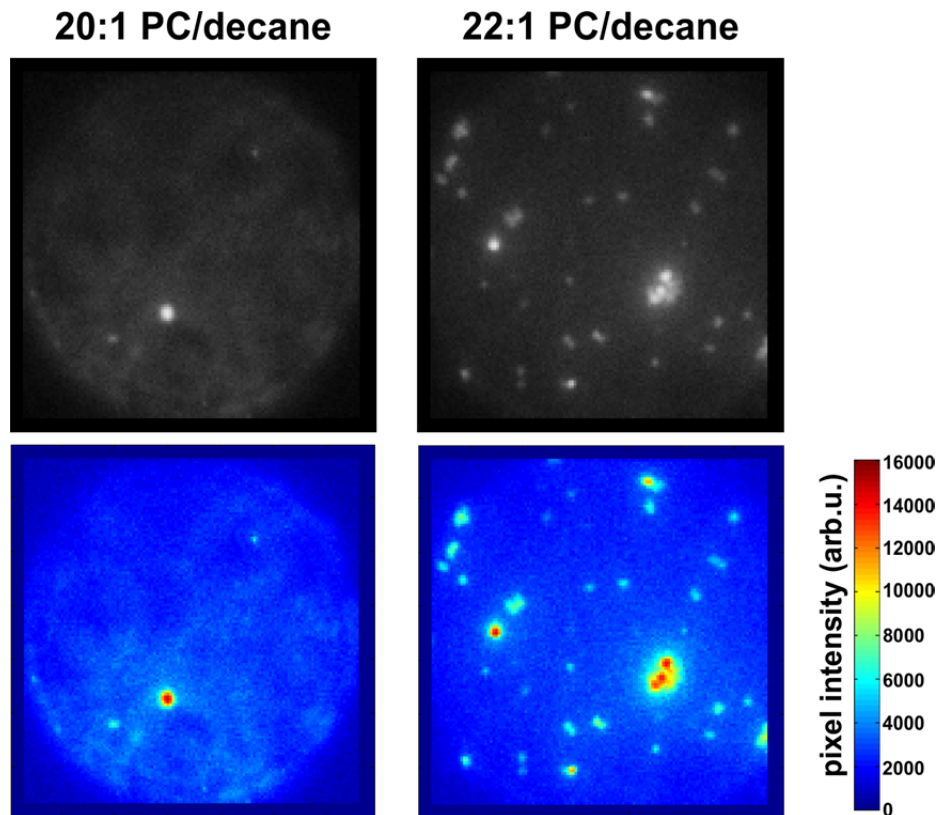
This work was supported by operating grants from NSERC (327201-2012) and the CIHR (MOP-102689) to R.B. R.B. holds a Canada Research Chair on the Molecular Mechanisms of Membrane Proteins. H.M. was financially supported by a FQRNT doctoral fellowship. GÉPROM is a research group funded by the FRQS.

## 5.7 Supplemental information

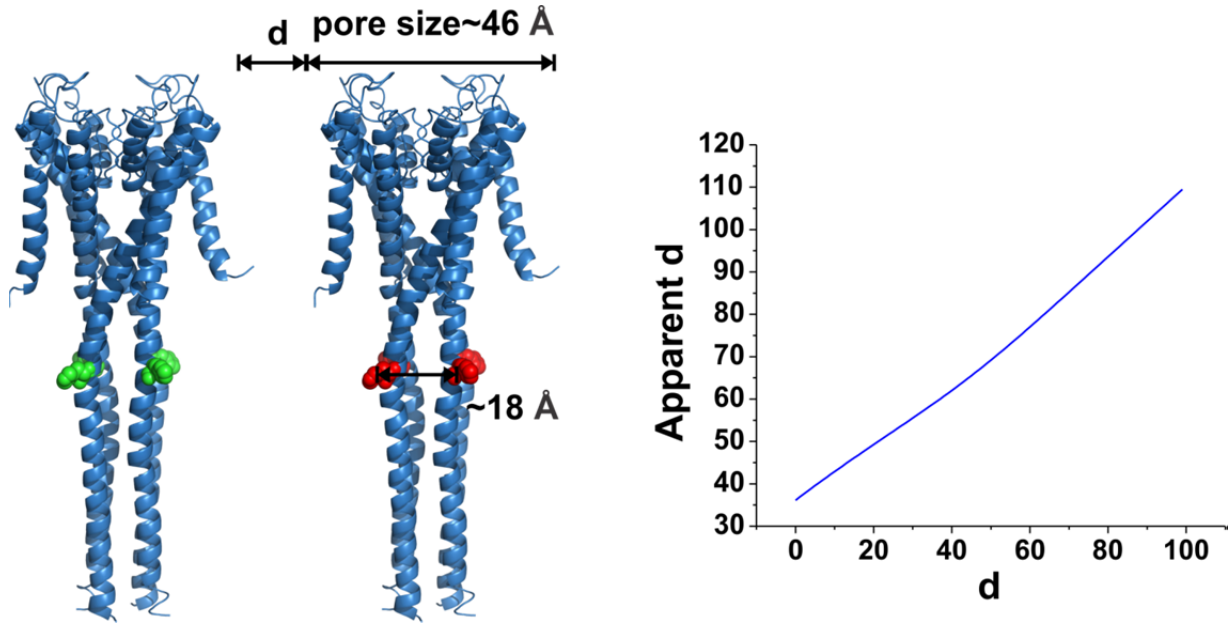
### 5.7.1 Supplemental figures



**Supplemental Figure S5.1** | Open probability of KcsA-H124C (E71A) as a function of pH for two different lipid compositions. Single-channels recordings did not reveal significant changes in the pH dependence of the open probability between DPhPC/decane and 22:1 PC-18:1 PG/decane bilayers (N>3 for each condition).



**Supplemental Figure S5.2** | Supplemental images of KcsA clustering in 20:1-22:1 PC/decane, where the hydrophobic thickness is estimated to be 54 Å and 58 Å, respectively (66). The bottom panels show the intensity map of the images shown on the top panels.



**Supplemental Figure S5.3** | Illustration of the influence of multi-labeling when evaluating distances by FRET measurements. When two channels separated by a distance  $r$  are fully labeled, one with the donor one other with the acceptor, the apparent distance  $r$  as seen in FRET appears generally higher. The pore size was estimated to  $46 \text{ \AA}$  and the distance between labels to  $18 \text{ \AA}$  (left). The relationship between the real and apparent distance  $r$  is shown on the

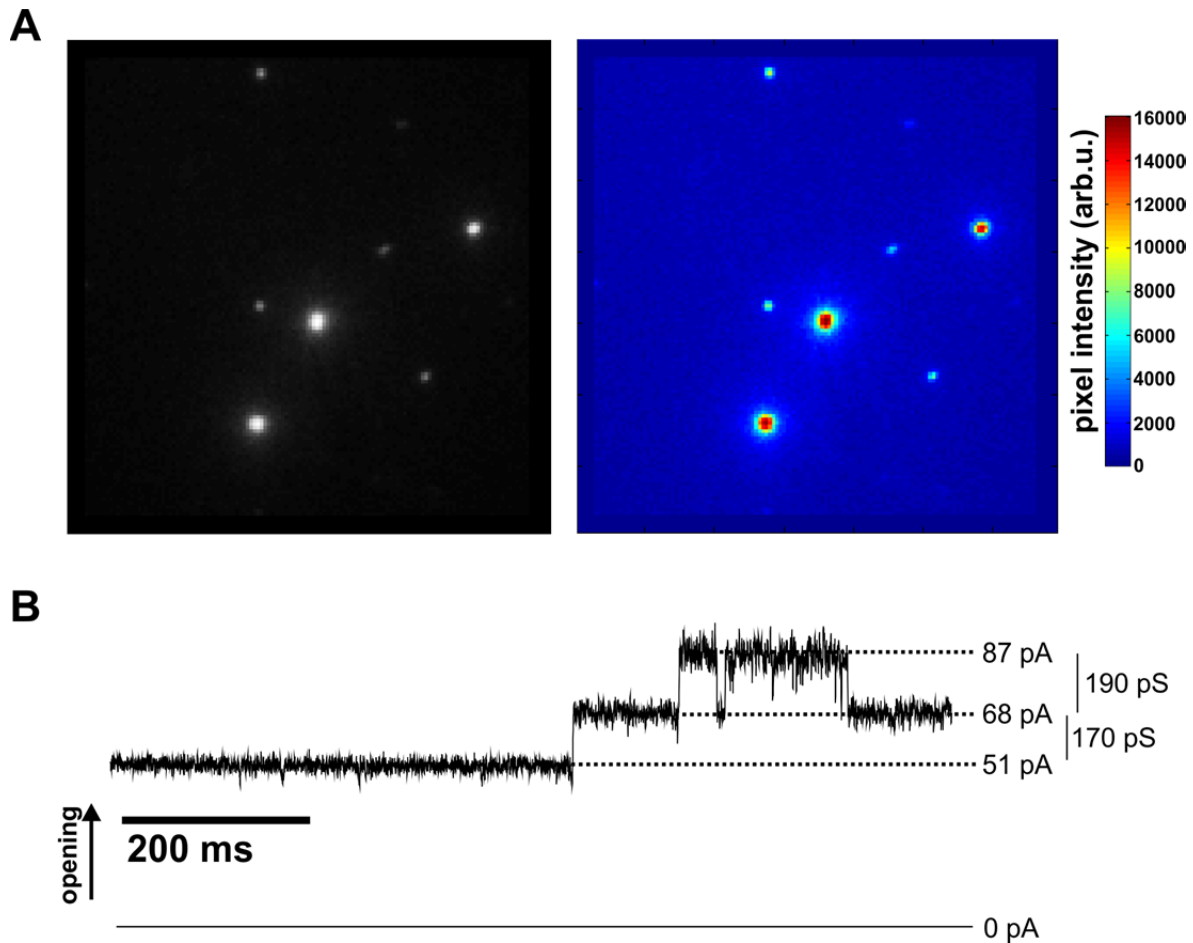
right. An energy transfer rate is calculated as  $k_{ij} = \frac{1}{\tau_D} \left( \frac{R_0}{d_{ij}} \right)^6$  based on the separating distance  $d$  for each donor ( $i$ )-acceptor ( $j$ ) combination. For each donor, the transfer efficiency can be

evaluated by  $E_i = \frac{\sum_j k_{ij}}{\sum_j k_{ij} + 1/\tau_D}$ . Since every donor undergoes the same process, the apparent

transfer efficiency becomes  $E = \frac{\sum_i E_i}{N}$  for a total of  $N$  donors. The corresponding apparent

distance  $r$  is then calculated as  $r = R_0 \left( \frac{1-E}{E} \right)^{1/6}$ .





**Supplemental Figure S5.4** | Example of a simultaneous fluorescence and current recording showing coupled gating activity. (A) Several clusters can be detected from the fluorescence image. (B) The associated current recording reveals conductance steps corresponding to more than one channel opening.

## 5.8 References

1. Weiss, A., and Littman, D. R. (1994) Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* **76**, 263-274
2. Sergeev, M., Swift, J. L., Godin, A. G., and Wiseman, P. W. (2012) Ligand-induced clustering of EGF receptors: A quantitative study by fluorescence image moment analysis. *Biophysical Chemistry* **161**, 50-53
3. Swift, J. L., Godin, A. G., Doré, K., Freland, L., Bouchard, N., Nimmo, C., Sergeev, M., De Koninck, Y., Wiseman, P. W., and Beaulieu, J.-M. (2011) Quantification of receptor tyrosine kinase transactivation through direct dimerization and surface density measurements in single cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 7016-7021

4. Han, Y., Moreira, I. S., Urizar, E., Weinstein, H., and Javitch, J. A. (2009) Allosteric communication between protomers of dopamine class A GPCR dimers modulates activation. *Nat Chem Biol* **5**, 688-695
5. Kawashima, N., Nakayama, K., Itoh, K., Itoh, T., Ishikawa, M., and Biju, V. (2010) Reversible dimerization of EGFR revealed by single-molecule fluorescence imaging using quantum dots. *Chemistry* **16**, 1186-1192
6. Groulx, N., McGuire, H., Laprade, R., Schwartz, J. L., and Blunck, R. (2011) Single molecule fluorescence study of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Aa reveals tetramerization. *J Biol Chem* **286**, 42274-42282
7. Collier, R. J. (2009) Membrane translocation by anthrax toxin. *Molecular aspects of medicine* **30**, 413-422
8. Thompson, James R., Cronin, B., Bayley, H., and Wallace, Mark I. (2011) Rapid Assembly of a Multimeric Membrane Protein Pore. *Biophysical journal* **101**, 2679-2683
9. Cebecauer, M., Spitaler, M., Serge, A., and Magee, A. I. (2010) Signalling complexes and clusters: functional advantages and methodological hurdles. *Journal of cell science* **123**, 309-320
10. Cascales, E., and Christie, P. J. (2003) The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nature reviews. Microbiology* **1**, 137-149
11. Goforth, R. L., Chi, A. K., Greathouse, D. V., Providence, L. L., Koeppe, R. E., and Andersen, O. S. (2003) Hydrophobic Coupling of Lipid Bilayer Energetics to Channel Function. *The Journal of general physiology* **121**, 477-493
12. Grage, S. L., Keleshian, A. M., Turdzeladze, T., Battle, A. R., Tay, W. C., May, R. P., Holt, S. A., Contera, S. A., Haertlein, M., Moulin, M., Pal, P., Rohde, P. R., Forsyth, V. T., Watts, A., Huang, K. C., Ulrich, A. S., and Martinac, B. (2011) Bilayer-mediated clustering and functional interaction of MscL channels. *Biophysical journal* **100**, 1252-1260
13. Iwasa, K., Ehrenstein, G., Moran, N., and Jia, M. (1986) Evidence for interactions between batrachotoxin-modified channels in hybrid neuroblastoma cells. *Biophysical journal* **50**, 531-537
14. Kaulin, Y. A., Schagina, L. V., Bezrukov, S. M., Malev, V. V., Feigin, A. M., Takemoto, J. Y., Teeter, J. H., and Brand, J. G. (1998) Cluster organization of ion channels formed by the antibiotic syringomycin E in bilayer lipid membranes. *Biophysical journal* **74**, 2918-2925
15. Molina, M. L., Barrera, F. N., Fernandez, A. M., Poveda, J. A., Renart, M. L., Encinar, J. A., Riquelme, G., and Gonzalez-Ros, J. M. (2006) Clustering and coupled gating

- modulate the activity in KcsA, a potassium channel model. *J Biol Chem* **281**, 18837-18848
16. Sumino, A., Yamamoto, D., Iwamoto, M., Dewa, T., and Oiki, S. (2014) Gating-Associated Clustering–Dispersion Dynamics of the KcsA Potassium Channel in a Lipid Membrane. *The Journal of Physical Chemistry Letters* **5**, 578-584
  17. Kasai, R. S., Suzuki, K. G., Prossnitz, E. R., Koyama-Honda, I., Nakada, C., Fujiwara, T. K., and Kusumi, A. (2011) Full characterization of GPCR monomer-dimer dynamic equilibrium by single molecule imaging. *J Cell Biol* **192**, 463-480
  18. McIntosh, T. J., and Simon, S. A. (2006) Roles of bilayer material properties in function and distribution of membrane proteins. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **35**, 177-198
  19. Andersen, O. S., and Koeppe, R. E., 2nd. (2007) Bilayer thickness and membrane protein function: an energetic perspective. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **36**, 107-130
  20. Hilgemann, D. W., and Ball, R. (1996) Regulation of cardiac Na<sup>+</sup>,Ca<sup>2+</sup> exchange and KATP potassium channels by PIP<sub>2</sub>. *Science* **273**, 956-959
  21. McLaughlin, S., Wang, J., Gambhir, A., and Murray, D. (2002) PIP<sub>2</sub> AND PROTEINS: Interactions, Organization, and Information Flow. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **31**, 151-175
  22. Furst, O., Mondou, B., and D'Avanzo, N. (2014) Phosphoinositide Regulation of Inward Rectifier Potassium (Kir) Channels. *Frontiers in Physiology* **4**
  23. Heginbotham, L., Kolmakova-Partensky, L., and Miller, C. (1998) Functional reconstitution of a prokaryotic K<sup>+</sup> channel. *The Journal of general physiology* **111**, 741-749
  24. Valiyaveetil, F. I., Zhou, Y., and MacKinnon, R. (2002) Lipids in the structure, folding, and function of the KcsA K<sup>+</sup> channel. *Biochemistry* **41**, 10771-10777
  25. Schmidt, D., Jiang, Q. X., and MacKinnon, R. (2006) Phospholipids and the origin of cationic gating charges in voltage sensors. *Nature* **444**, 775-779
  26. Borjesson, S. I., Hammarstrom, S., and Elinder, F. (2008) Lipoelectric modification of ion channel voltage gating by polyunsaturated fatty acids. *Biophysical journal* **95**, 2242-2253
  27. Faure, E., Starek, G., McGuire, H., Berneche, S., and Blunck, R. (2012) A limited 4 Å radial displacement of the S4-S5 linker is sufficient for internal gate closing in Kv channels. *J Biol Chem* **287**, 40091-40098

28. Faure, É., Thompson, C., and Blunck, R. (2014) Do lipids show state-dependent affinity to the voltage-gated potassium channel KvAP? *J Biol Chem*
29. Baldwin, P. A., and Hubbell, W. L. (1985) Effects of lipid environment on the light-induced conformational changes of rhodopsin. 2. Roles of lipid chain length, unsaturation, and phase state. *Biochemistry* **24**, 2633-2639
30. Tong, J., Briggs, M. M., and McIntosh, T. J. (2012) Water permeability of aquaporin-4 channel depends on bilayer composition, thickness, and elasticity. *Biophysical journal* **103**, 1899-1908
31. Yuan, C., O'Connell, R. J., Feinberg-Zadek, P. L., Johnston, L. J., and Treistman, S. N. (2004) Bilayer thickness modulates the conductance of the BK channel in model membranes. *Biophysical journal* **86**, 3620-3633
32. Perozo, E., Kloda, A., Cortes, D. M., and Martinac, B. (2002) Physical principles underlying the transduction of bilayer deformation forces during mechanosensitive channel gating. *Nature structural biology* **9**, 696-703
33. Yuan, C., O'Connell, R. J., Jacob, R. F., Mason, R. P., and Treistman, S. N. (2007) Regulation of the gating of BKCa channel by lipid bilayer thickness. *J Biol Chem* **282**, 7276-7286
34. Rusinova, R., Kim, Dorothy M., Nimigeon, Crina M., and Andersen, Olaf S. (2014) Regulation of Ion Channel Function by the Host Lipid Bilayer Examined by a Stopped-Flow Spectrofluorometric Assay. *Biophysical journal* **106**, 1070-1078
35. Williamson, I. M., Alvis, S. J., East, J. M., and Lee, A. G. (2002) Interactions of phospholipids with the potassium channel KcsA. *Biophysical journal* **83**, 2026-2038
36. Mouritsen, O. G., and Bloom, M. (1984) Mattress model of lipid-protein interactions in membranes. *Biophysical journal* **46**, 141-153
37. Fattal, D. R., and Ben-Shaul, A. (1993) A molecular model for lipid-protein interaction in membranes: the role of hydrophobic mismatch. *Biophysical journal* **65**, 1795-1809
38. Nielsen, C., Goulian, M., and Andersen, O. S. (1998) Energetics of inclusion-induced bilayer deformations. *Biophysical journal* **74**, 1966-1983
39. Harroun, T. A., Heller, W. T., Weiss, T. M., Yang, L., and Huang, H. W. (1999) Experimental evidence for hydrophobic matching and membrane-mediated interactions in lipid bilayers containing gramicidin. *Biophysical journal* **76**, 937-945
40. O'Keefe, A. H., East, J. M., and Lee, A. G. (2000) Selectivity in lipid binding to the bacterial outer membrane protein OmpF. *Biophysical journal* **79**, 2066-2074

41. East, J. M., and Lee, A. G. (1982) Lipid selectivity of the calcium and magnesium ion dependent adenosinetriphosphatase, studied with fluorescence quenching by a brominated phospholipid. *Biochemistry* **21**, 4144-4151
42. Powl, A. M., Wright, J. N., East, J. M., and Lee, A. G. (2005) Identification of the hydrophobic thickness of a membrane protein using fluorescence spectroscopy: studies with the mechanosensitive channel MscL. *Biochemistry* **44**, 5713-5721
43. Dan, N., Berman, A., Pincus, P., and Safran, S. A. (1994) Membrane-Induced Interactions between Inclusions. *J Phys Li* **4**, 1713-1725
44. Kralchevsky, P. A., Paunov, V. N., Denkov, N. D., and Nagayama, K. (1995) Stresses in Lipid-Membranes and Interactions between Inclusions. *J Chem Soc Faraday T* **91**, 3415-3432
45. Botelho, A. V., Huber, T., Sakmar, T. P., and Brown, M. F. (2006) Curvature and hydrophobic forces drive oligomerization and modulate activity of rhodopsin in membranes. *Biophysical journal* **91**, 4464-4477
46. Parton, D. L., Klingelhoefer, J. W., and Sansom, M. S. (2011) Aggregation of model membrane proteins, modulated by hydrophobic mismatch, membrane curvature, and protein class. *Biophysical journal* **101**, 691-699
47. Reynwar, B. J., Illya, G., Harmandaris, V. A., Muller, M. M., Kremer, K., and Deserno, M. (2007) Aggregation and vesiculation of membrane proteins by curvature-mediated interactions. *Nature* **447**, 461-464
48. Lewis, B. A., and Engelman, D. M. (1983) Bacteriorhodopsin remains dispersed in fluid phospholipid bilayers over a wide range of bilayer thicknesses. *Journal of molecular biology* **166**, 203-210
49. Sparr, E., Ash, W. L., Nazarov, P. V., Rijkers, D. T., Hemminga, M. A., Tieleman, D. P., and Killian, J. A. (2005) Self-association of transmembrane alpha-helices in model membranes: importance of helix orientation and role of hydrophobic mismatch. *J Biol Chem* **280**, 39324-39331
50. Cordero-Morales, J. F., Cuello, L. G., and Perozo, E. (2006) Voltage-dependent gating at the KcsA selectivity filter. *Nature structural & molecular biology* **13**, 319-322
51. Cordero-Morales, J. F., Cuello, L. G., Zhao, Y., Jogini, V., Cortes, D. M., Roux, B., and Perozo, E. (2006) Molecular determinants of gating at the potassium-channel selectivity filter. *Nature structural & molecular biology* **13**, 311-318
52. Blunck, R., McGuire, H., Hyde, H. C., and Bezanilla, F. (2008) Fluorescence detection of the movement of single KcsA subunits reveals cooperativity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 20263-20268

53. McGuire, H., Aurousseau, M. R. P., Bowie, D., and Blunck, R. (2012) Automating Single Subunit Counting of Membrane Proteins in Mammalian Cells. *J Biol Chem* **287**, 35912-35921
54. Mueller, P., Rudin, D. O., Tien, H. T., and Wescott, W. C. (1962) Reconstitution of Excitable Cell Membrane Structure in Vitro. *Circulation* **26**, 1167-1171
55. Ries, R. S., Choi, H., Blunck, R., Bezanilla, F., and Heath, J. R. (2004) Black Lipid Membranes: Visualizing the Structure, Dynamics, and Substrate Dependence of Membranes. *The Journal of Physical Chemistry B* **108**, 16040-16049
56. Groulx, N., Juteau, M., and Blunck, R. (2010) Rapid topology probing using fluorescence spectroscopy in planar lipid bilayer: the pore-forming mechanism of the toxin Cry1Aa of *Bacillus thuringiensis*. *The Journal of general physiology* **136**, 497-513
57. Chakrapani, S., Cordero-Morales, J. F., and Perozo, E. (2007) A quantitative description of KcsA gating II: single-channel currents. *The Journal of general physiology* **130**, 479-496
58. Thompson, A. N., Posson, D. J., Parsa, P. V., and Nimigean, C. M. (2008) Molecular mechanism of pH sensing in KcsA potassium channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 6900-6905
59. Iwamoto, M., and Oiki, S. (2013) Amphipathic antenna of an inward rectifier K<sup>+</sup> channel responds to changes in the inner membrane leaflet. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 749-754
60. Uysal, S., Cuello, L. G., Cortes, D. M., Koide, S., Kossiakoff, A. A., and Perozo, E. (2011) Mechanism of activation gating in the full-length KcsA K<sup>+</sup> channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 11896-11899
61. Uysal, S., Vasquez, V., Tereshko, V., Esaki, K., Fellouse, F. A., Sidhu, S. S., Koide, S., Perozo, E., and Kossiakoff, A. (2009) Crystal structure of full-length KcsA in its closed conformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 6644-6649
62. Verma, J. N., and Khuller, G. K. (1983) *Lipids of actinomycetes*, Academic Press, New York, NY, ETATS-UNIS
63. Kucerka, N., Nieh, M. P., and Katsaras, J. (2011) Fluid phase lipid areas and bilayer thicknesses of commonly used phosphatidylcholines as a function of temperature. *Biochimica et biophysica acta* **1808**, 2761-2771

64. Lewis, B. A., and Engelman, D. M. (1983) Lipid bilayer thickness varies linearly with acyl chain length in fluid phosphatidylcholine vesicles. *Journal of molecular biology* **166**, 211-217
65. Gross, L. C., Heron, A. J., Baca, S. C., and Wallace, M. I. (2011) Determining membrane capacitance by dynamic control of droplet interface bilayer area. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **27**, 14335-14342
66. Benz, R., Frohlich, O., Lauger, P., and Montal, M. (1975) Electrical capacity of black lipid films and of lipid bilayers made from monolayers. *Biochimica et biophysica acta* **394**, 323-334
67. Rotem, D., Mason, A., and Bayley, H. (2010) Inactivation of the KcsA potassium channel explored with heterotetramers. *The Journal of general physiology* **135**, 29-42
68. Pozo Navas, B., Lohner, K., Deutsch, G., Sevcsik, E., Riske, K. A., Dimova, R., Garidel, P., and Pabst, G. (2005) Composition dependence of vesicle morphology and mixing properties in a bacterial model membrane system. *Biochimica et biophysica acta* **1716**, 40-48
69. Yang, L., and Huang, H. W. (2002) Observation of a membrane fusion intermediate structure. *Science* **297**, 1877-1879
70. Hsieh, C. H., Sue, S. C., Lyu, P. C., and Wu, W. G. (1997) Membrane packing geometry of diphytanoylphosphatidylcholine is highly sensitive to hydration: phospholipid polymorphism induced by molecular rearrangement in the headgroup region. *Biophysical journal* **73**, 870-877
71. Kumar, V. V. (1991) Complementary molecular shapes and additivity of the packing parameter of lipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **88**, 444-448
72. Crowley, J. J., Treistman, S. N., and Dopico, A. M. (2005) Distinct structural features of phospholipids differentially determine ethanol sensitivity and basal function of BK channels. *Mol Pharmacol* **68**, 4-10
73. Blunck, R., Scheel, O., Muller, M., Brandenburg, K., Seitzer, U., and Seydel, U. (2001) New insights into endotoxin-induced activation of macrophages: involvement of a K<sup>+</sup> channel in transmembrane signaling. *Journal of immunology* **166**, 1009-1015
74. Solon, J., Gareil, O., Bassereau, P., and Gaudin, Y. (2005) Membrane deformations induced by the matrix protein of vesicular stomatitis virus in a minimal system. *Journal of General Virology* **86**, 3357-3363
75. Phillips, R., Ursell, T., Wiggins, P., and Sens, P. (2009) Emerging roles for lipids in shaping membrane-protein function. *Nature* **459**, 379-385

76. Grabe, M., Neu, J., Oster, G., and Nollert, P. (2003) Protein Interactions and Membrane Geometry. *Biophysical journal* **84**, 854-868
77. Ruta, V., Chen, J., and MacKinnon, R. (2005) Calibrated Measurement of Gating-Charge Arginine Displacement in the KvAP Voltage-Dependent K<sup>+</sup> Channel. *Cell* **123**, 463-475



## Chapitre 6

### Conclusion

Cette thèse présente des résultats relatifs à l'organisation de protéines formant des canaux ioniques. Pour chacune des études effectuées, la spectroscopie de fluorescence à l'échelle de la molécule unique a permis d'évaluer la composition des complexes. Le décompte de sous-unités de la toxine formeuse de pores de *B. thuringiensis* a notamment permis de démontrer la tétramérisation des monomères et de caractériser la dynamique d'oligomérisation dans une membrane lipidique selon la concentration. Une nouvelle méthode d'analyse automatisée a été développée pour dénombrer les sous-unités d'un complexe, même avec un faible ratio signal/bruit. Finalement, une étude du canal KcsA démontre leur regroupement dans des bicouches lipidiques de différentes compositions et l'effet sur la fonction du canal. Les mesures de courant indiquent que ces regroupements sont en mesure de déclencher une activité couplée de plusieurs canaux, où des ouvertures et fermetures concertées sont observées. Les résultats suggèrent qu'une déformation de la membrane induite par les canaux est à l'origine du regroupement de canaux et que l'activité couplée se produit via les lipides et non par interaction protéine-protéine. De plus, les résultats montrent que la présence de phospholipides anioniques n'est pas requise pour l'activation des canaux KcsA, contrairement à ce que plusieurs études précédentes suggéraient. Il semble plutôt que l'activité des canaux KcsA soit dépendante de la forme conique des lipides alors qu'ils sont dans la phase cristalline liquide, ce qui réduirait possiblement la pression latérale de la membrane sur les canaux aux interfaces solution/lipides. Si les lipides sont plutôt de forme cylindrique, le regroupement des canaux permet de franchir la barrière d'énergie nécessaire à leur ouverture.

## 6.1 Oligomerization de la toxine Cry1Aa de *B. thuringiensis* : retour sur les résultats

Le chapitre 3 décrit le regroupement de monomères de la toxine Cry1Aa de *B. thuringiensis* dans un environnement lipidique. La toxine a été purifiée et reconstituée dans des vésicules lipidiques, qui une fois à la surface d'une lamelle de verre, forment des bicouches supportées. Les monomères ont été marqués d'un fluorophore pour déterminer la composition de complexes individuels par décompte des étapes de photoblanchiment. Différentes concentrations de toxines ont été testées, permettant ainsi de décrire la dynamique du regroupement de la toxine. À faible concentration, les monomères existent en grande proportion, mais des complexes composés de deux, trois ou quatre monomères sont aussi observés. En augmentant la concentration de toxine Cry1Aa, la proportion de complexes tétramériques augmente, alors que l'analyse du nombre de monomères marqués par complexe prend progressivement la forme d'une distribution binomiale de quatrième ordre (Fig. 3.2). À ces concentrations plus élevées, une distribution de Poisson ne permet clairement pas d'expliquer les résultats (Fig. 3.3 A). Cette comparaison entre les distributions de Poisson et binomiale a été présentée afin de mettre en évidence que les monomères ne s'assemblent pas indéfiniment selon la concentration. À faible concentration, une distribution de Poisson peut bien correspondre aux données observées. Il s'agit plus précisément d'une distribution des états selon la statistique de Poisson, mais où une distribution binomiale est associée à chacun des états pour tenir compte de l'efficacité de marquage. Le résultat demeure toutefois une distribution de Poisson tel que décrit aux équations 2.2-2.4. Ce résultat suggère qu'il existe plusieurs états oligomériques et que les monomères s'assemblent selon la concentration. Un état unique tétramérique représenté par la distribution binomiale de quatrième ordre ne peut correspondre à ces données, puisque l'efficacité de marquage devrait être environ trois fois plus petite que celle prédite. À l'inverse, aux plus hautes concentrations testées, l'état tétramérique semble être majoritairement perçu. Cette situation ne peut pas correspondre à une distribution de Poisson, étant donné le manque de compte à 5,6 ou 7 sous-unités fluorescentes par complexe (Fig. 3.3 A). Les résultats sont mieux approximés par une distribution binomiale de quatrième ordre qui décrit la probabilité de marquage de cet état. Cependant, la différence entre les valeurs théoriques de la distribution binomiale et les valeurs expérimentales demeure

importante, ce qui suggère que la composition de la toxine n'est pas restreinte à un tétramère. La tétramérisation de la toxine est alors décrite dans un modèle cinétique présenté à la figure 3.4.

Dans ce modèle, le nombre de sous-unités formant le complexe à une concentration donnée est décrit selon les taux de transition entre les différents états oligomériques. Le calcul associé est présenté à la section 3.8.1. Pour vérifier si le modèle peut expliquer les résultats obtenus, la probabilité de marquage  $p$  a été considérée en attribuant une distribution binomiale à chacun des états  $n$  (1,2,3 ou 4 sous-unités par complexe). Le nombre de complexes dont  $k$  sous-unités sont détectés ( $SU_{obs}(k)$ ), pour une concentration donnée, est donc décrit par

$$SU_{obs}(k) = \sum_{n=k}^4 \left( \frac{\alpha \cdot [Cry1Aa]}{\beta} \right)^{n-1} A_1 \frac{n!}{k!(n-k)!} p^k (1-p)^{n-k}, k \in \{1; 2; 3; 4\} \quad (\text{éq. 6.1})$$

Le nombre moyen de sous-unités détectées est alors calculé et comparé avec les résultats obtenus aux différentes concentrations avec l'équation suivante :

$$\langle k \rangle = \sum_{k=1}^4 k \left( \frac{SU_{obs}(k)}{\sum_{k=1}^4 SU_{obs}(k)} \right) \quad (\text{éq. 6.2})$$

En minimisant l'erreur entre les courbes expérimentales et théoriques selon les paramètres du modèle, les résultats sont bien représentés par le modèle (Fig. 3.4).

Toutefois, il peut aussi être instructif d'exprimer la moyenne du nombre de sous-unité par complexe, plutôt que de considérer le nombre moyen de sous-unités détectées par complexe. Dans ce cas, la probabilité d'être dans chacun des états  $P_n$  peut être déterminée selon  $A_n = \left(\frac{\alpha'}{\beta}\right)^{n-1} A_1$ , où  $\alpha' = \alpha[Cry1Aa]$  tel que décrit à la section 3.8.1. En considérant  $A_{tot} = A_1 + A_2 + A_3 + A_4$ ,  $P_n = \frac{A_n}{A_{tot}} = \left(\frac{\alpha'}{\beta}\right) \frac{A_1}{A_{tot}} = \left(\frac{\alpha'}{\beta}\right) P_1$ .  $P_1$  se simplifie davantage par les séries géométriques :

$$P_1 = \frac{A_1}{A_1 + A_2 + A_3 + A_4} = \frac{1}{1 + \left(\frac{\alpha'}{\beta}\right) + \left(\frac{\alpha'}{\beta}\right)^2 + \left(\frac{\alpha'}{\beta}\right)^3}$$

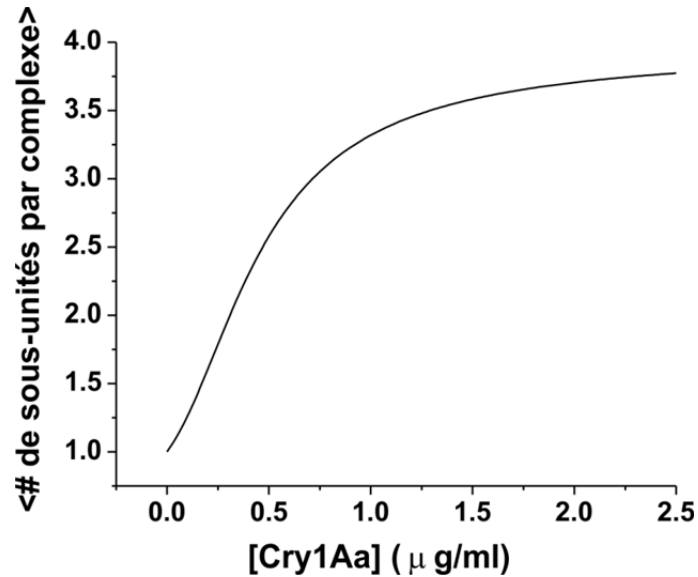
Puisque  $1 + x + x^2 + x^3 = \frac{1 - x^4}{1 - x}$  (série géométrique)

$$P_1 = \frac{1 - \left(\frac{\alpha'}{\beta}\right)}{1 - \left(\frac{\alpha'}{\beta}\right)^4}$$

La moyenne du nombre de sous-unités est évaluée ainsi :

$$\begin{aligned} \langle SU \rangle &= \sum_{SU=1}^4 SU \cdot P_{SU} \\ &= P_1 + 2P_2 + 3P_3 + 4P_4 \\ &= P_1 \left( 1 + 2\left(\frac{\alpha'}{\beta}\right) + 3\left(\frac{\alpha'}{\beta}\right)^2 + 4\left(\frac{\alpha'}{\beta}\right)^3 \right) \\ \text{si } y &= 1 + 2\left(\frac{\alpha'}{\beta}\right) + 3\left(\frac{\alpha'}{\beta}\right)^2 + 4\left(\frac{\alpha'}{\beta}\right)^3 \\ y\left(\frac{\alpha'}{\beta}\right) &= \left(\frac{\alpha'}{\beta}\right) + 2\left(\frac{\alpha'}{\beta}\right)^2 + 3\left(\frac{\alpha'}{\beta}\right)^3 + 4\left(\frac{\alpha'}{\beta}\right)^4 \\ y - y\left(\frac{\alpha'}{\beta}\right) &= \left[ 1 + \left(\frac{\alpha'}{\beta}\right) + \left(\frac{\alpha'}{\beta}\right)^2 + \left(\frac{\alpha'}{\beta}\right)^3 \right] - 4\left(\frac{\alpha'}{\beta}\right)^4 \\ &\quad \text{série géométrique} \\ y\left(1 - \left(\frac{\alpha'}{\beta}\right)\right) &= \frac{1 - \left(\frac{\alpha'}{\beta}\right)^4}{1 - \left(\frac{\alpha'}{\beta}\right)} - 4\left(\frac{\alpha'}{\beta}\right)^4 \\ y &= \frac{1 - \left(\frac{\alpha'}{\beta}\right)^4}{\left(1 - \left(\frac{\alpha'}{\beta}\right)\right)^2} - \frac{4\left(\frac{\alpha'}{\beta}\right)^4}{1 - \left(\frac{\alpha'}{\beta}\right)} \\ \text{donc, } \langle SU \rangle &= \left( \frac{1 - \left(\frac{\alpha'}{\beta}\right)}{1 - \left(\frac{\alpha'}{\beta}\right)^4} \right) \left( \frac{1 - \left(\frac{\alpha'}{\beta}\right)^4}{\left(1 - \left(\frac{\alpha'}{\beta}\right)\right)^2} - \frac{4\left(\frac{\alpha'}{\beta}\right)^4}{1 - \left(\frac{\alpha'}{\beta}\right)} \right) \\ \langle SU \rangle &= \frac{1}{1 - \left(\frac{\alpha'}{\beta}\right)} - \frac{4\left(\frac{\alpha'}{\beta}\right)^4}{1 - \left(\frac{\alpha'}{\beta}\right)^4} \end{aligned} \tag{éq. 6.3}$$

Cette équation peut être traduite graphiquement avec les paramètres du modèle déterminés précédemment (Fig. 6.1).



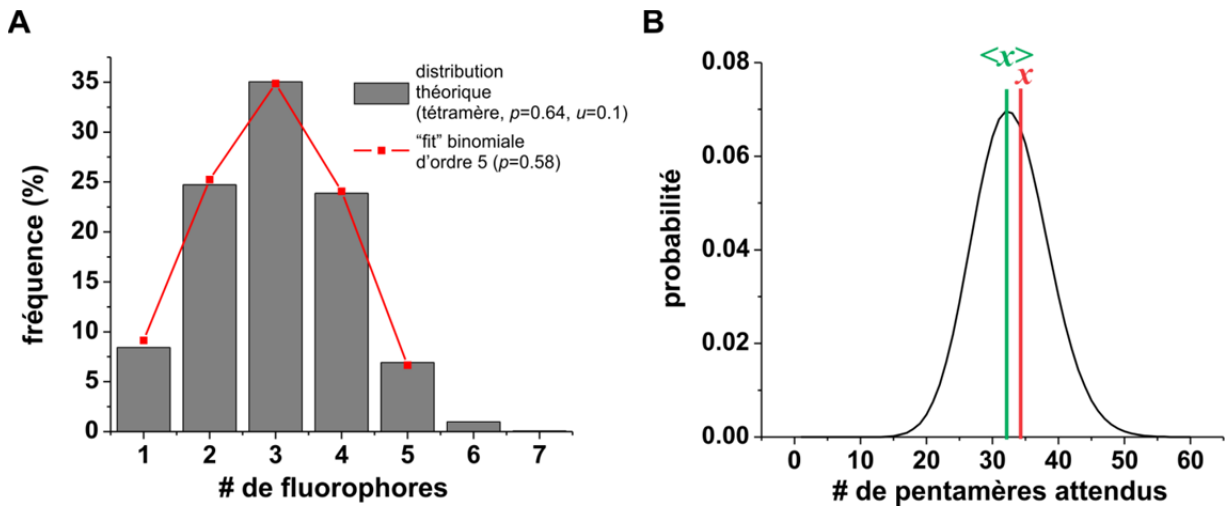
**Figure 6.1** | Illustration de l'oligomérisation de la toxine Cry1Aa en fonction de la concentration. Le nombre de sous-unités composant le complexe augmente avec la concentration de toxine, jusqu'à la configuration tétramérique.

## 6.2 Oligomerization de la toxine Cry1Aa de *B. thuringiensis* : limitations de l'analyse de sous-unités fluorescentes

Les résultats obtenus au troisième chapitre révèlent qu'il est peu probable que l'emplacement du fluorophore ou la composition lipidique soit responsable de la tétramérisation, puisque deux positions de marquage et différents types de phospholipide révèlent ce même résultat. Malgré cette tendance évidente de regroupement tétramérique, quelques complexes avec cinq ou six sous-unités marquées ont été détectés. Ces événements ont pu être expliqués par une proportion de marquage non-spécifique, estimée à environ 4%, qui ajoute potentiellement plus d'un fluorophore par monomère.

Puisque la proportion de marquage non-spécifique est relativement petite par rapport au marquage spécifique dans ces expériences, l'analyse demeure précise. Le troisième chapitre décrit d'ailleurs cette précision en vérifiant quantitativement la possibilité que le complexe soit un pentamère. En assumant une distribution pentamérique, le faible nombre de complexes à cinq fluorophores observés ne pouvait pas justifier cette hypothèse (Fig. S3.2). Une probabilité inférieure à 1% est en effet accordée à cette proposition, ce qui permet d'affirmer avec confiance que le complexe observé aux plus hautes concentrations est un tétramère. Si la

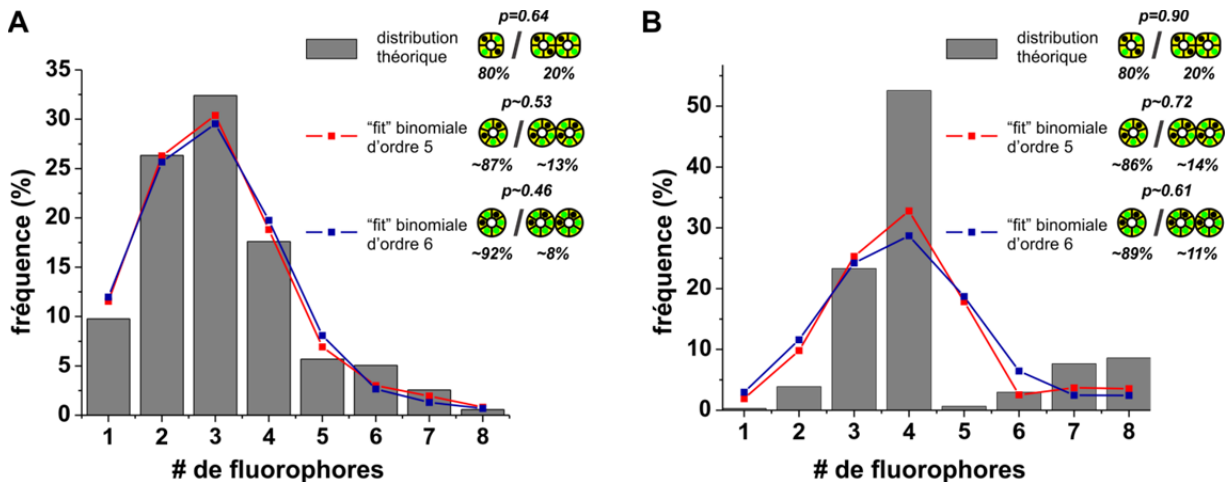
proportion de marquage non spécifique avait été plus importante, cette conclusion aurait été beaucoup plus difficile à obtenir. Par exemple, la distribution de la figure 6.2 illustre le cas d'un tétramère où la probabilité qu'un monomère soit fluorescent est  $p = 64\%$ , comme estimé au troisième chapitre, et où le marquage non-spécifique s'élève à  $u = 10\%$ . Ces conditions ne permettraient pas de distinguer aussi clairement un complexe tétramérique d'un complexe pentamérique.



**Figure 6.2** | Problème du marquage non-spécifique. (A) Simulation d'une distribution d'un tétramère où la probabilité de marquage spécifique  $p$  est de 0.64 et où la probabilité de marquage non-spécifique  $u$  est de 0.1 (barres verticales). Une binomiale de cinquième ordre est alors ajustée à cette distribution pour obtenir la valeur de  $p$  correspondante ( $p=0.58$ ; ligne rouge). (B) Distribution du nombre de complexes à cinq fluorophores attendus pour une population totale de 500 complexes en assumant une composition tétramérique (éq. S3.2). En moyenne, 33 complexes à cinq fluorophores sont attendus (ligne verte). Selon la distribution binomiale simulée en (A), environ 34 complexes (ligne rouge) à cinq fluorophores devraient être observés en raison du marquage non-spécifique. Ce marquage non-spécifique (10%) introduit donc un artéfact important qui empêche de déduire l'oligomérisation précisément. Le calcul est le même que celui présenté à la section 3.8.2.

La distribution simulée peut facilement s'apparenter à une distribution binomiale de cinquième ordre avec une probabilité de fluorescence  $p = 58\%$  (Fig. 6.2 A). Pour une population totale de 500 complexes, le nombre de complexes à cinq fluorophores est alors du même ordre, même plus élevé, que le nombre attendu pour un pentamère (Fig. 6.2 B). Le marquage non-spécifique agit donc comme facteur limitant dans l'analyse des complexes par décompte des sauts de fluorescence. La possibilité d'observer plus d'un complexe par point

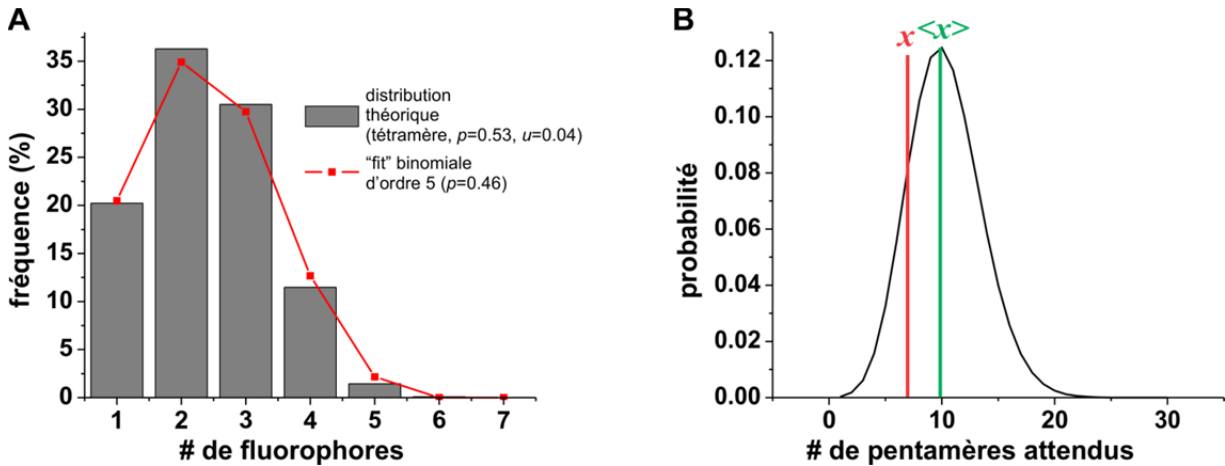
fluorescent isolé (*spot*), comme au quatrième chapitre, a d'ailleurs un effet similaire puisque ces événements déplacent la distribution du nombre de fluorophores vers des distributions binomiales d'ordres plus élevées, comme pour le marquage non-spécifique. La figure 6.3 A illustre ce phénomène, en considérant le cas de la toxine sans marquage non-spécifique, mais cette fois avec une probabilité de colocalisation de 20%.



**Figure 6.3** | Problème de la colocalisation de complexes (A) Si la probabilité que deux complexes soient colocalisés est de 20%, une distribution tétramérique avec une probabilité de marquage de  $p=0.64$  peut aussi correspondre à une distribution binomiale d'ordre  $> 4$  en ajustant les valeurs de  $p$  et de la proportion de complexes colocalisés. (B) Par contre, si la valeur de  $p$  est augmentée à 0.9, les distributions binomiales d'ordres supérieurs ne peuvent pas s'ajuster à la distribution tétramérique. Les deux populations de canaux unitaires et de canaux colocalisés peuvent être distinguées clairement.

Même si la descente rapide entre le nombre de complexes à quatre et cinq fluorophores semble indiquer la présence d'un tétramère, une ambiguïté existe (Fig. 6.3 A). Cette distribution peut aussi correspondre, par exemple, à un pentamère avec une probabilité  $p = 53\%$  et une proportion de colocalisation de 13%. Des distributions binomiales d'ordres plus élevés peuvent aussi y correspondre. Pour mieux distinguer l'ordre réel de l'oligomérisation, la valeur de  $p$  peut d'abord être déterminée. Par exemple, pour des protéines purifiées, l'efficacité de marquage peut directement être mesurée. Cette valeur peut être précise si, avant l'expérience, l'échantillon est complètement protégé des sources pouvant exciter les fluorophores, et donc réduire la probabilité de fluorescence. Pour des monomères fusionnés à une protéine fluorescente et exprimés en cellule, la valeur de  $p$  s'obtient d'abord à

partir de complexes connus, comme dans les travaux du quatrième chapitre. Il est important de noter que ce problème d’ambiguïté disparaît avec des valeurs de  $p$  se rapprochant de l’unité, comme illustré à la figure 6.3 B.

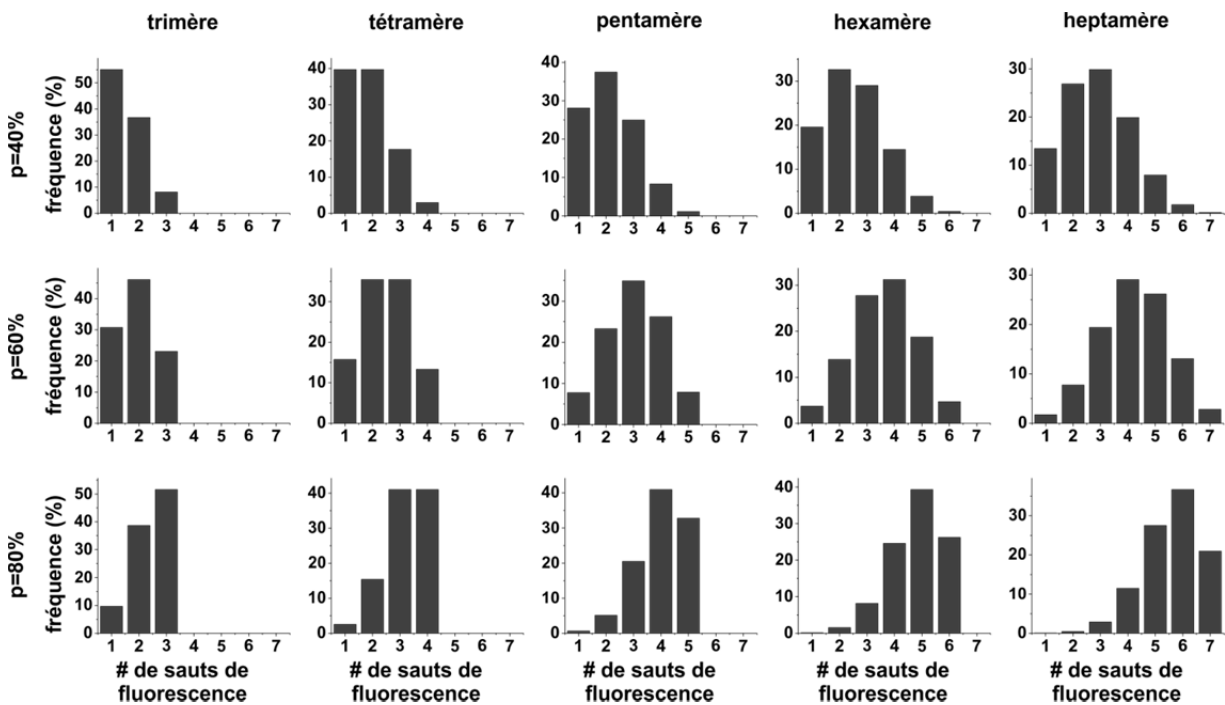


**Figure 6.4** | Problème des petites valeurs de probabilité de fluorescence par monomère (A) Distribution du tétramère de la Cry1Aa reconstruite en assumant une valeur de  $p$  diminuée (0.53) pour la distribution tétramérique, mais avec la même probabilité  $u$  de marquage non-spécifique. Une distribution binomiale de cinquième ordre est ajustée à cette distribution pour obtenir la valeur de  $p$  correspondante ( $p=0.46$ ). (B) Contrairement à l’expérience originale où  $p \sim 0.64$  (Fig. S3.2), la distribution tétramérique ne peut pas être identifiée clairement. Le nombre obtenu de complexes à cinq fluorophores est d’environ 7 (ligne rouge), ce qui est nettement dans la zone attendu pour une composition pentamérique (moyenne d’environ 10, ligne verte). Ce calcul assume une population de 500 complexes (éq. S3.2).

La probabilité de marquage spécifique affecte également de manière importante la précision de l’analyse. Plus cette valeur est faible, plus les distributions sont difficilement distinguables. La figure 6.4 montre ce phénomène, alors que la probabilité qu’un monomère de toxine soit fluorescent est réduite à 0.53, la même valeur que celle obtenue au quatrième chapitre pour les protéines fusionnées à GFP. En gardant la même proportion de marquage non-spécifique, il devient maintenant plus difficile de discriminer la composition pentamérique comme au troisième chapitre. L’effet d’une petite valeur de marquage spécifique est d’autant plus perceptible pour les ordres d’oligomérisation élevés, comme illustré à la figure 6.5. Une probabilité de marquage spécifique élevée permet à l’inverse d’identifier différentes populations (Fig. 6.3 B). Dans le cas idéal d’un marquage complet et entièrement spécifique, chacune des traces de fluorescence permettrait de déterminer



directement l'ordre du complexe correspondant. Une statistique précise sur les différentes populations existantes pourrait alors être obtenue. Bien que ce cas de figure soit difficilement atteignable, il est parfois possible d'obtenir une efficacité de marquage proche de l'unité, comme au cinquième chapitre. Pour les expériences du troisième chapitre, l'efficacité de marquage est suffisante pour détecter clairement le déplacement des populations vers une composition tétramérique en augmentant la concentration de toxine. Aux concentrations intermédiaires, les distributions peuvent donc être représentées par une somme de distributions binomiales du premier au quatrième ordre. Il n'est cependant pas possible dans ce cas d'identifier individuellement chacune des différentes populations.



**Figure 6.5** | Distributions binomiales du nombre de sauts de fluorescence pour des oligomères du troisième au septième ordre où la probabilité de fluorescence est de 40%, 60% ou 80%.

### 6.3 Oligomerization de la toxine Cry1Aa de *B. thuringiensis* : perspectives

Les expériences n'ont pas permis de déterminer si l'oligomérisation se produit en solution ou après l'insertion dans la membrane. De plus, il n'est pas clair si le rassemblement

des sous-unités dépend de la concentration, comme illustré à la figure 3.4, ou si le nombre de monomères par vésicule est le facteur limitant de l'oligomérisation. Dans ce dernier cas, la formation tétramérique se produirait systématiquement en autant que les monomères soient disponibles. Les monomères restant formeraient alors des oligomères d'ordre inférieur. Selon l'analyse performée, les deux possibilités peuvent expliquer les résultats.

Pour clarifier ces interrogations, l'oligomérisation pourrait être évaluée en bicouche lipidique planaire, comme présenté au cinquième chapitre, où le ratio monomère/vésicule n'est plus un facteur limitant. En injectant la toxine non reconstituée sur une bicouche lipidique planaire, aux mêmes concentrations testées en bicouches supportées, le processus d'oligomérisation peut être caractérisé en temps résolu. Les toxines en solution pourraient en principe être différenciées des toxines insérées dans la membrane selon leurs propriétés de diffusion. Une toxine en solution peut diffuser en trois dimensions, alors que les toxines de la membrane diffusent seulement latéralement. De plus, la diffusion dans la membrane serait plus lente qu'en solution, du à une viscosité plus importante dans la membrane (1-3). Ces différences pourraient permettre de déterminer où l'oligomérisation se produit. Une fois les complexes formés, il serait aussi possible de détecter si les complexes demeurent sous forme tétramérique ou si des événements de dissociation sont possibles. Pour plus de précision, des expériences de FRET devraient être effectuées. En marquant une portion des monomères avec un fluorophore de type donneur et une autre portion avec un fluorophore de type accepteur, la proximité entre les monomères peut être quantifiée.

Même si la toxine tend à s'unir en tétramères, la fonction associée reste à être déterminée. Il est possible que les canaux ioniques soient formés par des complexes d'ordre inférieur à 4. Puisque la configuration en bicouche lipidique planaire permet de mesurer la conduction ionique simultanément à la distribution spatiale, la fonction des canaux pourrait être évaluée relativement à leur oligomérisation, de façon similaire au cinquième chapitre.

## **6.4 Analyse automatique pour le décompte de sous-unités**

Au quatrième chapitre, une méthode a été développée pour analyser automatiquement l'oligomérisation par décompte des étapes discrètes de photoblanchiment. Ces travaux ont été poussés principalement par l'utilisation de cellules mammifères pour exprimer des canaux

ioniques dont les monomères sont fusionnés à sfGFP (*superfolder green fluorescent protein*). Ce système d'expression, contrairement aux bicouches supportées utilisées avec des protéines purifiées, produit un important bruit de fluorescence qui complique l'analyse des traces de fluorescence. Les flavines et lipofuscines pourraient contribuer en grande partie à ce bruit (4,5). L'excitation des fluorophores à la membrane en réflexion totale interne (TIRF : *total internal reflection fluorescence*) parvient à éliminer une grande portion du bruit de fluorescence mais le ratio entre le signal à détecter et le bruit de fluorescence demeure généralement faible ( $< 2$ ). Afin de procéder à une analyse objective et précise, un programme informatique, nommé *PIF*, a été créé. Celui-ci détermine l'emplacement des canaux marqués à l'intérieur d'une région sélectionnée, filtre le signal d'intérêt, compte le nombre d'étapes de photoblanchiment et décide si la trace est de qualité suffisante. La méthode a été optimisée avec des simulations de traces de fluorescence, à partir desquels une précision de plus de 90% a pu être estimée pour les conditions expérimentales de notre système. *PIF* a pu retrouver la composition tétramérique des récepteurs glutamate GluK2 et la composition pentamérique des récepteurs à la glycine GlyRa1.

L'analyse révèle que deux canaux pouvaient parfois s'assembler, puisque des complexes avec un nombre de sous-unités marquées supérieur à la composition du canal ont été détectés. Les distributions montrent qu'environ 16-23% des complexes étaient co-localisés. Ces regroupements pourraient avoir un rôle physiologique, comme discuté au chapitre 4. Il est aussi possible que des canaux localisés dans un compartiment interne, comme le réticulum endoplasmique, viennent s'ajouter aux signaux détectés à la membrane, étant donné la proximité entre la membrane et certains organites.

Pour les deux récepteurs étudiés, l'analyse des distributions binomiales révèle une même probabilité de fluorescence pour sfGFP, démontrant que le programme performe des analyses cohérentes et précises. La probabilité de fluorescence de sfGFP a été évaluée à 53% dans nos conditions expérimentales, alors que l'expression se fait à 37°C. Bien que sfGFP soit un dérivé de GFP optimisé pour l'expression à 37°C (6), le degré de maturation apparaît nettement plus élevé pour eGFP (*enhanced GFP*) dans des ovocytes de *Xenopus* à 18°C, où une valeur d'environ 75-80% a été reportée (7). La maturation du chromophore de GFP est notamment sensible à la température (8), ce qui peut possiblement expliquer ce résultat. Il est

aussi possible que le photoblanchiment de fluorophores avant les enregistrements de fluorescence réduise la probabilité de fluorescence apparente. Il est toutefois peu probable que ce phénomène se soit produit significativement, puisque les échantillons étaient bien protégés des sources pouvant exciter les fluorophores. Comme expliqué à la section 6.2, cette faible probabilité de fluorescence obtenue, en plus de la colocalisation de canaux, peut potentiellement limiter les analyses. Pour distinguer plus clairement l'oligomérisation d'un complexe dont la composition n'est pas connue, il serait nécessaire de fixer cette probabilité de fluorescence ( $p = 0.53$ ) pour tester la correspondance avec des distributions binomiales de différents ordres. Une valeur aussi petite ne permet cependant pas de différencier facilement différentes populations possibles, comme illustré à la figure 6.3.

Le programme d'analyse développé a été conçu pour des canaux marqués de protéines fluorescentes et exprimés dans des cellules mammifères, mais ne se limite pas à cette configuration. L'analyse peut aussi fonctionner sur des protéines purifiées, comme au chapitre 3, ou exprimées à la membrane d'ovocytes. Il est cependant possible que la précision de la méthode varie selon le fluorophore utilisé. Les propriétés de *blinking* peuvent notamment influencer largement la précision de l'algorithme de détection des sauts de photoblanchiment. Plus un fluorophore entre fréquemment et longtemps dans un état temporaire non-fluorescent (*blinking*), moins l'algorithme est précis. Ces variations de fluorescence évaluées à partir de simulation constituent la principale limitation du programme *PIF*. Dans l'état actuel du programme, la détection des sauts discrets d'intensité ne peut se faire que dans une seule direction. Ainsi, les fluctuations entre deux états de fluorescence sont ignorées, ce qui crée des erreurs dans les niveaux d'intensité attribués. Une prochaine génération de ce programme pourrait considérer ces fluctuations pour améliorer la précision de l'analyse. La structure du programme devrait être alors considérablement altérée, puisque le caractère unidirectionnel des sauts de fluorescence est un des critères principaux pour segmenter la trace de fluorescence.

Ce type de méthode de détection de sauts discrets représente un outil potentiel pour tous les domaines qui caractérisent les différents états accessibles d'un système à l'échelle de la molécule unique. À ce niveau de précision, la transition entre différents états est perçue comme un saut du signal mesuré. C'est notamment le cas pour les mesures de la conduction

ionique d'un seul canal (9,10), du mouvement de sous-unités d'un canal (11), des états de repliement de protéines (12,13), des mouvements de moteurs moléculaires (14-16), et d'événements de transfert d'électrons (17,18). Un défi important réside dans le développement d'algorithmes pouvant détecter ces changements avec grande précision alors que le signal baigne dans un bruit souvent important. Plusieurs travaux ont contribué à faire progresser le développement de ce type d'algorithme, mais surtout dans les cas où le ratio signal/bruit est élevé ou si les états sont déjà connus ou attribués manuellement (19-23). Les travaux du quatrième chapitre visent particulièrement les mesures où le ratio signal/bruit est faible, sans connaissance préalable des états. L'étude présentée constitue un avancement important dans cette direction.

## 6.5 Fluorométrie en voltage imposé de canaux KcsA

L'étude du cinquième chapitre combine la spectroscopie de fluorescence à l'échelle de la molécule unique aux mesures électrophysiologiques. Ce type d'expérience qui intègre plusieurs techniques simultanément permet notamment de corrélérer les mesures et donc de caractériser davantage les phénomènes observés. Le rassemblement de canaux ioniques est donc étudié par fluorométrie en voltage imposé, faisant suite à l'association de sous-unités de canaux ioniques étudiée aux troisième et quatrième chapitres. Des événements d'association de canaux résolus au canal unique ont été directement observés par spectroscopie de fluorescence en bicouche lipidique planaire. Des regroupements de canaux ont été identifiés selon l'intensité de fluorescence de complexes isolés. En principe, la technique de photoblanchiment présentée aux chapitres 3 et 4 aurait pu être utilisée pour déterminer le nombre de sous-unités par complexe composé de quelques canaux. Cependant, il serait difficile de compter le nombre de sauts de photoblanchiment pour plus de 8 sous-unités, puisque la trace de fluorescence prendrait de plus en plus la forme d'une décroissance exponentielle. De plus, le photoblanchiment devait être évité du mieux possible pour caractériser le regroupement de canaux au cours du temps.

Les enregistrements de canaux qui s'unissent révèlent une interaction de longue portée ( $\sim 1-2,5 \mu\text{m}$ ), ce qui suggère que le rassemblement des canaux se produit via des interactions avec la membrane lipidique, plutôt que par des interactions directes entre les

canaux. Pour déterminer si une disparité entre la section hydrophobe des canaux et de la bicouche provoque ces associations, des lipides avec différentes longueurs de chaîne d'acides gras ont été testées. Étant donné que les canaux s'associent dans toutes les conditions d'épaisseur examinées, la principale cause du regroupement de KcsA n'est probablement pas la disparité entre les sections hydrophobiques, bien qu'elle puisse toutefois y contribuer. Il semble alors probable le canal puisse déformer la membrane de sorte à créer des microdomaines avec une certaine courbure de membrane (Fig. 1.5), ce qui se traduirait en regroupement de canaux (24-27). La forme conique du canal peut potentiellement introduire ces déformations. Selon la distance d'interaction observée, celles-ci seraient alors de l'ordre du micromètre. Il semble d'ailleurs que des déformations du même ordre soient causées par la protéine M (*matrix protein*), alors qu'elles s'assemblent à la membrane de liposomes géants (GUVs).

En mesurant la conduction ionique simultanément à la fluorescence, l'effet fonctionnel du regroupement a pu être évalué. En présence des associations de canaux KcsA, des ouvertures et fermetures concertées sont apparues fréquemment dans les mesures, indiquant une coopérativité entre des canaux rapprochés. Ce phénomène de coopération de canaux a particulièrement été observé pour des bicouches lipidiques formées uniquement par des phospholipides neutres de phosphatidylcholine (PC). Alors que des études précédentes suggèrent que la présence de phospholipides avec tête chargée négativement est nécessaire à l'ouverture de KcsA (28,29), ce résultat montre que l'état ouvert peut être favorisé par la proximité d'autres canaux. Pour mieux comprendre ce mécanisme, l'activité de canaux unitaires a été évaluée en fonction de la composition lipidique. Les résultats révèlent que des canaux uniques (non regroupés) peuvent s'ouvrir facilement sans lipide anionique à condition que les lipides soient de forme conique dans la phase cristalline liquide (Fig. 5.7). Cette forme pourrait réduire la pression latérale dans la région du *bundle crossing* (Fig. 1.1) et donc favoriser la conformation ouverte. Ce mécanisme est particulièrement soutenu par des mesures dans des bicouches composées uniquement de POPE (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine) dans la phase cristalline liquide (~40°C) ou de DPhPC (1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine). Dans des lipides de forme cylindrique, comme pour le DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) ou le POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-

sn-glycero-3-phosphocholine), un canal unique ne semble pas pouvoir franchir la barrière d'énergie requise pour l'ouverture. Cependant, si des canaux sont assemblés dans un même microdomaine, leur ouverture devient possible. Puisque le passage à l'état ouvert pour ce type de lipide nécessite possiblement une déformation importante de la membrane, l'énergie de plusieurs canaux pourrait donc arriver à une modulation de la membrane suffisante, entraînant ainsi un comportement de canaux couplés.

Ce mécanisme de couplage fonctionnel contrôlé par des interactions indirectes via la membrane, plutôt que par des interactions directes entre les canaux, semble être supporté par les mesures de FRET. Celles-ci ont permis d'estimer que les canaux assemblés sont séparés par environ 60 Å, ce qui paraît trop loin pour permettre une interaction directe. Une distance similaire (30-140 Å) a été obtenue récemment par microscopie à force atomique pour des canaux KcsA à pH 4 diffusant dans une bicouche supportée (30). Il est toutefois difficile d'exclure absolument toute interaction directe entre les canaux. Afin de vérifier plus précisément, des mesures de FRET pourraient être prises pour d'autres positions situées dans le cytosol, notamment vers l'extrémité N-terminale qui n'apparaît pas dans la structure par cristallographie aux rayons X. Cette région forme une hélice alpha (M0), qui est potentiellement flexible et mobile (31,32). Toutefois, même s'il y avait interaction directe, les résultats indiquant une déformation de la membrane par les canaux n'en seraient pas modifiés. Ainsi, les mécanismes proposés demeurent possibles même dans cette éventualité. Cette situation ouvrirait donc d'autres avenues d'interprétation.

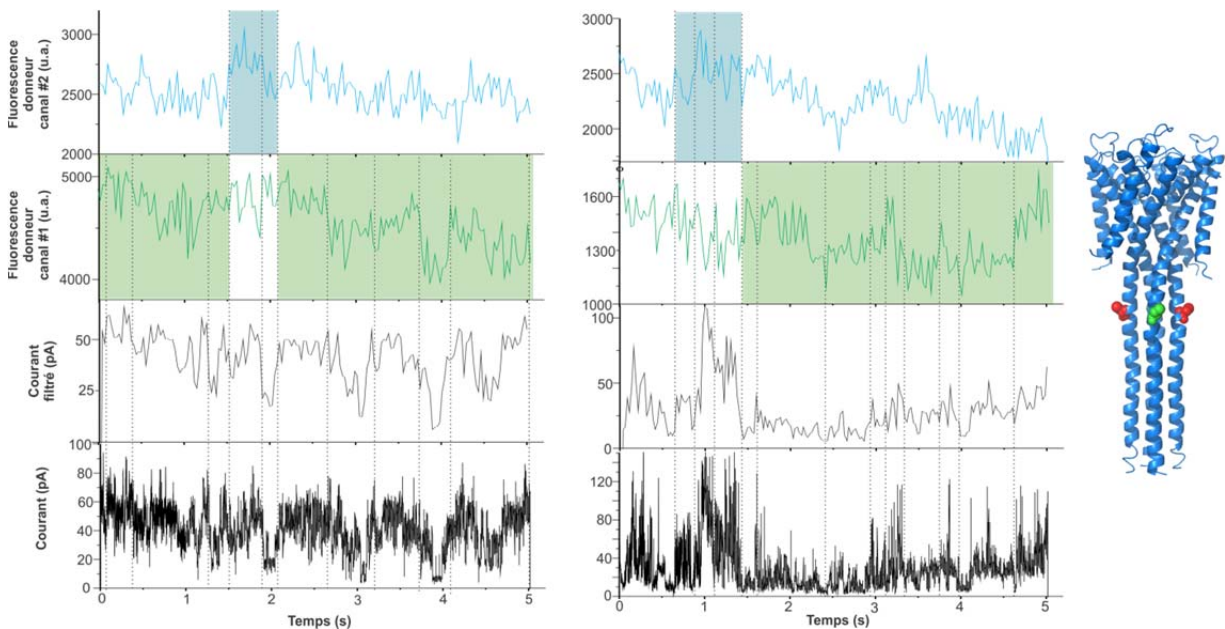
Les travaux du cinquième chapitre amènent une nouvelle perspective de l'interaction des canaux ioniques avec la membrane lipidique, alors que la forme des lipides et le regroupement de canaux KcsA dans des bicouches influencent significativement leur fonction. Dans ce contexte, la présence de lipides chargés négativement pourrait ne pas être nécessaire pour KcsA dans son environnement physiologique. Les actinomycètes, desquelles KcsA a été extrait, contiennent principalement des lipides avec des groupes méthyles sur les chaînes aliphatiques, comme c'est le cas du DPhPC (33). Il est donc possible que la fonction du canal dans son environnement d'origine soit exclusivement contrôlée par la forme des lipides et par le regroupement de canaux.

D'autre part, il a été proposé précédemment que les différents niveaux de conductance des canaux, dont les niveaux de conductance partielle, ou sous-conductance, pourraient émerger des associations entre canaux (34). La conductance normalement associée à un seul canal proviendrait donc d'actions concertées de quelques canaux regroupés. Cependant, plusieurs études suggèrent que les niveaux de sous-conductance se manifestent plutôt par des ouvertures partielles où les sous-unités ne sont pas toutes en conformation ouverte (11,35). Les résultats présentés dans cette thèse ne sont pas suffisants pour démontrer l'une ou l'autre de ces hypothèses. Pour étudier les mécanismes des niveaux de sous-conductance, les mouvements d'ouverture d'un seul canal doivent pouvoir être résolus simultanément à la conduction ionique de ce même canal. Le système de fluorométrie en voltage imposé peut en principe permettre ce type d'étude. Le mouvement d'ouverture des sous-unités du canal KcsA peut spécialement être mesuré via un fluorophore lié à la position 116 ou 119, tel que démontré précédemment (11,36), ou par mesures de FRET. Des efforts importants ont d'ailleurs été déployés pour ce projet. Cependant, les résultats ne sont pas suffisamment conclusifs. La figure 6.6 montrent le type de résultat obtenu pour KcsA.

Des mesures de FRET à la position 124 entre les fluorophores AlexaFluor-488-C<sub>5</sub>-maleimide et Dylight-594-maleimide révèlent des fluctuations de fluorescence qui corrélient parfois avec la conduction ionique, mais pas de façon générale. Bien que plusieurs des fluctuations puissent représenter la réalité des mouvements des sous-unités, d'autres paramètres peuvent aussi influencer les résultats. Premièrement, la diffusion des canaux dans la bicouche augmente l'erreur sur les fluctuations mesurées puisque l'excitation et la détection peut varier légèrement dépendant de la localisation. Même avec une intensité d'excitation et une efficacité de détection relativement uniforme, des petites variations peuvent perturber l'analyse, qui dépend uniquement des fluctuations hors du bruit. Deuxièmement, puisque les canaux peuvent s'assembler, il est possible que le mouvement d'une seule sous-unité soit parfois difficilement distinguable parmi un nombre significatif de sous-unités impliquées dans la mesure. Troisièmement, il est aussi possible que des fluctuations soient provoquées par des changements d'environnement local du fluorophore, en addition au signal de FRET (11). Finalement, les états temporaires non-fluorescents (*blinking*) sont aussi perçus comme des fluctuations de fluorescence et peuvent donc faire apparaître de « faux » mouvements à



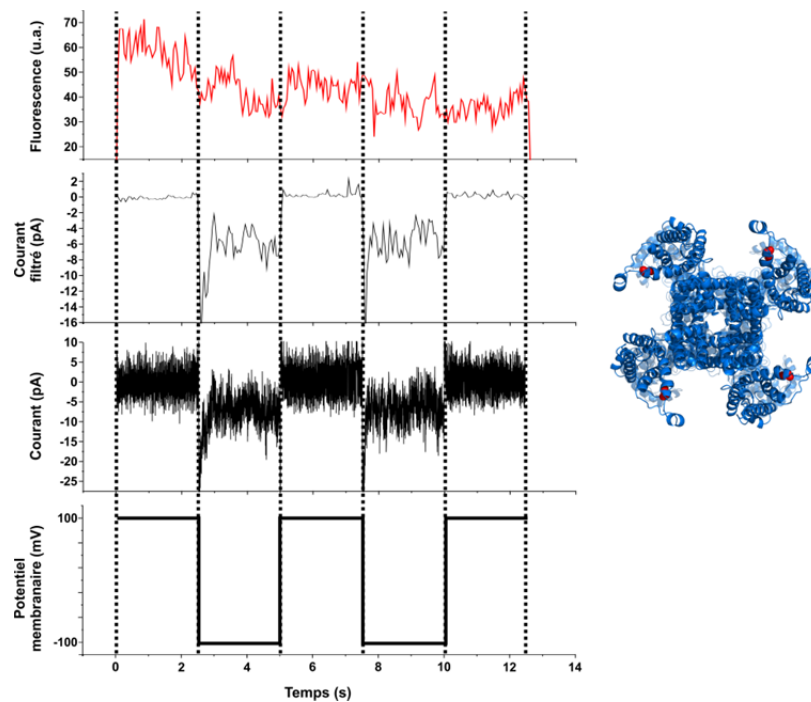
l'occasion. Des mesures de fluorescence aux positions 116 ou 119 ont mené à des résultats similaires. Dans ce cas, un marquage unique avec TMRM (*Tetramethylrhodamine-5-Maleimide*) devait permettre d'associer l'ouverture du canal avec un changement d'environnement local du fluorophore (11,36).



**Figure 6.6** | Fluorométrie en voltage imposé du canal potassique KcsA où deux canaux ont été identifiés comme étant potentiellement responsables du courant observé. Les mesures ont été prises dans des bicouches de DPhPC/décane. La fluorescence des molécules de type donneur aux positions 124 est illustrée pour deux canaux avec le courant ionique filtré (pour comparer les traces selon le même taux d'acquisition que la fluorescence) et le courant non filtré. Le ratio entre le nombre de molécules de type donneur et de type accepteur est en moyenne de 1:1. Le système utilisé est le même que celui présenté au cinquième chapitre. La structure du canal est montrée (vue de côté) avec la position H124 identifiée en vert ou en rouge pour illustrer la présence de donneurs et d'accepteurs, respectivement.

Des mesures ont aussi été prises sur le canal potassique dépendant du voltage de *Shaker* à partir de membranes d'ovocytes isolées par centrifugation sur gradient de sucrose (37,38), où le canal est surexprimé. En marquant le canal à la position 359 du canal avec le fluorophore TMRM, il est possible de suivre l'activation des régions sensibles au voltage (39,40), qui est couplée à l'ouverture du pore (41-46). Puisque l'ouverture de ce canal est activé par une dépolarisation membranaire (47), le système de fluorométrie en voltage imposé permet de contrôler l'ouverture des canaux, contrairement au canal KcsA, dont l'ouverture

dépend du pH (28,48,49). La figure 6.7 montre un résultat obtenu alors qu'une fraction de la membrane d'ovocyte isolée a été reconstituée dans la bicouche lipidique planaire. Des changements de fluorescence semblent corrélés généralement bien avec la dépolarisation membranaire et la conduction ionique, sauf vers la fin de la mesure où le photoblanchiment est possiblement trop important. Ces résultats soutiennent que la technique de fluorométrie en voltage imposé est en principe possible à l'échelle du canal unique.



**Figure 6.7** | Fluorométrie en voltage imposé avec le canal potassique de *Shaker*. La mesure a été prise dans une bicouche de POPC :POPE :POPG :POPS selon une proportion massique de 3 :2 :1 :1. Le potentiel membranaire varie entre -100 mV et 100 mV, où le côté intracellulaire est mis à la terre. Le courant obtenu est relativement bruyant. Un premier filtre de Chung-Kennedy (50) est alors appliqué pour résoudre les fluctuations importantes. La trace obtenue est ensuite filtrée pour que le taux d'acquisition soit le même qu'en fluorescence. Le système utilisé est celui présenté au cinquième chapitre. La structure du canal avec est illustrée (vue de dessus) avec la position A359 en rouge.

Ces travaux ont permis de faire progresser la détection simultanée du courant ionique et du mouvement des sous-unités à l'échelle du canal unique. La spectroscopie de fluorescence est une méthode puissante spécialement capable de détecter des changements de conformation de complexes marqués. Étant donné le caractère dynamique des canaux ioniques dans la

membrane cellulaire, cette méthode permet d'étudier plusieurs questions quant aux relations structure-fonction. Les résultats obtenus devraient encourager la continuité des efforts dans cette même direction et le développement de nouvelles approches. Par exemple, afin de diminuer le bruit du courant ionique et d'observer plus facilement un canal à la fois, les bicouches pourraient être formées dans un support plus petit, de l'ordre de quelques micromètres. Celui-ci remplacerait le support d'environ 150-250  $\mu\text{m}$  décrit au cinquième chapitre. Un trou micrométrique dans une lamelle de verre pourrait potentiellement remplir ce rôle. En injectant des protéoliposomes géants sur cette lamelle, une bicouche contenant un seul canal pourrait être formée (comme pour les bicouches supportées sur lamelles de verre), celle-ci ne contenant aucun solvant (e.g. décane, hexadécane). Pour éviter d'avoir un bruit de fond important autour du trou micrométrique, une couche opaque devrait être posée sur la surface du dessous.

## 6.6 Bibliographie

1. Vaz, W. L. C., Goodsaid-Zalduondo, F., and Jacobson, K. (1984) Lateral diffusion of lipids and proteins in bilayer membranes. *FEBS letters* **174**, 199-207
2. Zareh, Shannon K., DeSantis, Michael C., Kessler, Jonathan M., Li, J.-L., and Wang, Y. M. (2012) Single-Image Diffusion Coefficient Measurements of Proteins in Free Solution. *Biophysical journal* **102**, 1685-1691
3. Lenaz, G. (1987) Lipid fluidity and membrane protein dynamics. *Bioscience reports* **7**, 823-837
4. Benson, R. C., Meyer, R. A., Zaruba, M. E., and McKhann, G. M. (1979) Cellular autofluorescence--is it due to flavins? *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **27**, 44-48
5. Schnell, S. A., Staines, W. A., and Wessendorf, M. W. (1999) Reduction of Lipofuscin-like Autofluorescence in Fluorescently Labeled Tissue. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **47**, 719-730
6. Pedelacq, J.-D., Cabantous, S., Tran, T., Terwilliger, T. C., and Waldo, G. S. (2006) Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nat Biotech* **24**, 79-88
7. Ulbrich, M. H., and Isacoff, E. Y. (2007) Subunit counting in membrane-bound proteins. *Nature methods* **4**, 319-321

8. Siemering, K. R., Golbik, R., Sever, R., and Haseloff, J. (1996) Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. *Current Biology* **6**, 1653-1663
9. Kolb, H. A., Lauger, P., and Bamberg, E. (1975) Correlation analysis of electrical noise in lipid bilayer membranes: kinetics of gramicidin A channels. *J Membr Biol* **20**, 133-154
10. Neher, E., Sakmann, B., and Steinbach, J. H. (1978) The extracellular patch clamp: a method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **375**, 219-228
11. Blunck, R., McGuire, H., Hyde, H. C., and Bezanilla, F. (2008) Fluorescence detection of the movement of single KcsA subunits reveals cooperativity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 20263-20268
12. Bornschlöggl, T., and Rief, M. (2011) Single-Molecule Protein Unfolding and Refolding Using Atomic Force Microscopy. in *Single Molecule Analysis* (Peterman, E. J. G., and Wuite, G. J. L. eds.), Humana Press. pp 233-250
13. Rief, M., Gautel, M., Oesterhelt, F., Fernandez, J. M., and Gaub, H. E. (1997) Reversible Unfolding of Individual Titin Immunoglobulin Domains by AFM. *Science* **276**, 1109-1112
14. Abbondanzieri, E. A., Greenleaf, W. J., Shaevitz, J. W., Landick, R., and Block, S. M. (2005) Direct observation of base-pair stepping by RNA polymerase. *Nature* **438**, 460-465
15. Mallik, R., Carter, B. C., Lex, S. A., King, S. J., and Gross, S. P. (2004) Cytoplasmic dynein functions as a gear in response to load. *Nature* **427**, 649-652
16. Svoboda, K., Schmidt, C. F., Schnapp, B. J., and Block, S. M. (1993) Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry. *Nature* **365**, 721-727
17. Fan, F.-R. F., and Bard, A. J. (1997) An Electrochemical Coulomb Staircase: Detection of Single Electron-Transfer Events at Nanometer Electrodes. *Science* **277**, 1791-1793
18. Tkachev, Y., and Kotov, A. (2006) Detection of Single-Electron Transfer Events and Capacitance Measurements in Submicron Floating-Gate Memory Cells. in *Solid-State Device Research Conference, 2006. ESSDERC 2006. Proceeding of the 36th European*
19. Draber, S., and Schultze, R. (1994) Detection of jumps in single-channel data containing subconductance levels. *Biophysical journal* **67**, 1404-1413
20. VanDongen, A. M. (1996) A new algorithm for idealizing single ion channel data containing multiple unknown conductance levels. *Biophysical journal* **70**, 1303-1315

21. Kerssemakers, J. W., Munteanu, E. L., Laan, L., Noetzel, T. L., Janson, M. E., and Dogterom, M. (2006) Assembly dynamics of microtubules at molecular resolution. *Nature* **442**, 709-712
22. Qin, F. (2004) Restoration of single-channel currents using the segmental k-means method based on hidden Markov modeling. *Biophysical journal* **86**, 1488-1501
23. Qin, F., and Li, L. (2004) Model-based fitting of single-channel dwell-time distributions. *Biophysical journal* **87**, 1657-1671
24. Botelho, A. V., Huber, T., Sakmar, T. P., and Brown, M. F. (2006) Curvature and hydrophobic forces drive oligomerization and modulate activity of rhodopsin in membranes. *Biophysical journal* **91**, 4464-4477
25. Parton, D. L., Klingelhoefer, J. W., and Sansom, M. S. (2011) Aggregation of model membrane proteins, modulated by hydrophobic mismatch, membrane curvature, and protein class. *Biophysical journal* **101**, 691-699
26. Reynwar, B. J., Illya, G., Harmandaris, V. A., Muller, M. M., Kremer, K., and Deserno, M. (2007) Aggregation and vesiculation of membrane proteins by curvature-mediated interactions. *Nature* **447**, 461-464
27. McMahon, H. T., and Gallop, J. L. (2005) Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature* **438**, 590-596
28. Heginbotham, L., Kolmakova-Partensky, L., and Miller, C. (1998) Functional reconstitution of a prokaryotic K<sup>+</sup> channel. *The Journal of general physiology* **111**, 741-749
29. Valiyaveetil, F. I., Zhou, Y., and MacKinnon, R. (2002) Lipids in the structure, folding, and function of the KcsA K<sup>+</sup> channel. *Biochemistry* **41**, 10771-10777
30. Sumino, A., Yamamoto, D., Iwamoto, M., Dewa, T., and Oiki, S. (2014) Gating-Associated Clustering–Dispersion Dynamics of the KcsA Potassium Channel in a Lipid Membrane. *The Journal of Physical Chemistry Letters* **5**, 578-584
31. Iwamoto, M., Shimizu, H., Inoue, F., Konno, T., Sasaki, Y. C., and Oiki, S. (2006) Surface Structure and Its Dynamic Rearrangements of the KcsA Potassium Channel upon Gating and Tetrabutylammonium Blocking. *J Biol Chem* **281**, 28379-28386
32. Iwamoto, M., and Oiki, S. (2013) Amphipathic antenna of an inward rectifier K<sup>+</sup> channel responds to changes in the inner membrane leaflet. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 749-754
33. Embley, T. M., Smida, J., and Stackebrandt, E. (1988) Reverse transcriptase sequencing of 16S ribosomal RNA from *Faenia rectivirgula*, *Pseudonocardia*

- thermophila and *Saccharopolyspora hirsuta*, three wall type IV actinomycetes which lack mycolic acids. *Journal of general microbiology* **134**, 961-966
34. Molina, M. L., Barrera, F. N., Fernandez, A. M., Poveda, J. A., Renart, M. L., Encinar, J. A., Riquelme, G., and Gonzalez-Ros, J. M. (2006) Clustering and coupled gating modulate the activity in KcsA, a potassium channel model. *J Biol Chem* **281**, 18837-18848
  35. Chapman, M. L., and VanDongen, A. M. (2005) K channel subconductance levels result from heteromeric pore conformations. *The Journal of general physiology* **126**, 87-103
  36. Blunck, R., Cordero-Morales, J. F., Cuello, L. G., Perozo, E., and Bezanilla, F. (2006) Detection of the opening of the bundle crossing in KcsA with fluorescence lifetime spectroscopy reveals the existence of two gates for ion conduction. *The Journal of general physiology* **128**, 569-581
  37. Hill, W. G., Southern, N. M., MacIver, B., Potter, E., Apodaca, G., Smith, C. P., and Zeidel, M. L. (2005) Isolation and characterization of the *Xenopus* oocyte plasma membrane: a new method for studying activity of water and solute transporters. *American journal of physiology. Renal physiology* **289**, F217-224
  38. Perez, G., Lagrutta, A., Adelman, J. P., and Toro, L. (1994) Reconstitution of expressed KCa channels from *Xenopus* oocytes to lipid bilayers. *Biophysical journal* **66**, 1022-1027
  39. 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
  40. Cha, A., and Bezanilla, F. (1997) Characterizing Voltage-Dependent Conformational Changes in the ShakerK<sup>+</sup> Channel with Fluorescence. *Neuron* **19**, 1127-1140
  41. 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<sup>+</sup> Channels. *J Biol Chem* **285**, 14005-14019
  42. Haddad, G. A., and Blunck, R. (2011) Mode shift of the voltage sensors in Shaker K<sup>+</sup> channels is caused by energetic coupling to the pore domain. *The Journal of general physiology* **137**, 455-472
  43. Kalstrup, T., and Blunck, R. (2013) Dynamics of internal pore opening in KV channels probed by a fluorescent unnatural amino acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*
  44. Long, S. B., Campbell, E. B., and MacKinnon, R. (2005) Voltage Sensor of Kv1.2: Structural Basis of Electromechanical Coupling. *Science* **309**, 903-908

45. Lu, Z., Klem, A. M., and Ramu, Y. (2002) Coupling between Voltage Sensors and Activation Gate in Voltage-gated K<sup>+</sup> Channels. *The Journal of general physiology* **120**, 663-676
46. Blunck, R., and Batulan, Z. (2012) Mechanism of electromechanical coupling in voltage-gated potassium channels. *Frontiers in pharmacology* **3**, 166
47. Hodgkin, A. L., and Huxley, A. F. (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of physiology* **117**, 500-544
48. Heginbotham, L., LeMasurier, M., Kolmakova-Partensky, L., and Miller, C. (1999) Single streptomyces lividans K(+) channels: functional asymmetries and sidedness of proton activation. *The Journal of general physiology* **114**, 551-560
49. Thompson, A. N., Posson, D. J., Parsa, P. V., and Nimigean, C. M. (2008) Molecular mechanism of pH sensing in KcsA potassium channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 6900-6905
50. Chung, S. H., and Kennedy, R. A. (1991) Forward-backward non-linear filtering technique for extracting small biological signals from noise. *Journal of neuroscience methods* **40**, 71-86





## *Appendice I*

### **Sommaire des équations**

## Chapitre 2

éq. 2.1 :  $P_{bin}(k) = \frac{n!}{k!(n-k)!} p^k (1-p)^{n-k} = \binom{n}{k} p^k (1-p)^{n-k}$  .....p. 35

éq. 2.2 :  $P_{poiss}(k) = \frac{\lambda^k e^{-\lambda}}{k!}$  .....p. 36

éq. 2.3 :  $P_{obs}(k) = \sum_{n=k}^{\infty} \left[ \frac{\lambda^n e^{-\lambda}}{n!} \right] \left[ \frac{n!}{k!(n-k)!} p^k (1-p)^{n-k} \right]$  .....p. 36  
Poisson Binomiale

éq. 2.4 :  $P_{obs}(k) = \frac{(\lambda p)^k e^{-\lambda p}}{k!}$  .....p. 37

éq. 2.5 :  $F_k = \sum_{n=0}^{N-1} f_n \cdot e^{-i2\pi kn/N}$  .....p. 41

éq. 2.6 :  $H_k = \begin{cases} 1 & \text{if } k < k_0 \\ 0 & \text{if } k > k_0 \end{cases}$  .....p. 41

éq. 2.7 :  $g_n = \frac{1}{N} \sum_{k=0}^{N-1} G_k \cdot e^{i2\pi kn/N}$  .....p. 41

éq. 2.8 :  $F(k,l) = \sum_{a=0}^{N-1} \sum_{b=0}^{N-1} f(a,b) e^{-i2\pi \left( \frac{ka}{N} + \frac{lb}{N} \right)}$  .....p. 41

$$f(a,b) = \frac{1}{N^2} \sum_{k=0}^{N-1} \sum_{l=0}^{N-1} F(k,l) e^{i2\pi \left( \frac{ka}{N} + \frac{lb}{N} \right)}$$

éq. 2.9 :  $t = \frac{\overline{x_1} - \overline{x_2}}{\sqrt{\frac{s_1^2}{N} + \frac{s_2^2}{N}}}$  .....p. 45

$$f_T(t) = \frac{1}{\sqrt{k\pi}} \frac{\Gamma\left(\frac{k+1}{2}\right)}{\Gamma\left(\frac{k}{2}\right)} \left(1 + \frac{t^2}{k}\right)^{-\frac{k+1}{2}}, \text{ où}$$

éq. 2.10 :  $\Gamma(\alpha) = \int_0^{\infty} x^{\alpha-1} e^{-x} dx$ , et où .....p. 46

$$k = \frac{(s_1^2 + s_2^2)/N}{(s_1^4 + s_2^4)/(N(N-1))}$$

$$\text{éq. 2.11 : } \chi^2 = \sum_{i=1}^N \left( \frac{x_i - \mu_i}{\sigma} \right)^2 \dots\dots\dots \text{p. 46}$$

$$\text{éq. 2.12 : } \varepsilon(\lambda_{exc}) = \frac{-\log\left(\frac{I}{I_0}\right)}{l \cdot C} = \frac{A}{l \cdot C} \dots\dots\dots \text{p. 49}$$

$$\text{éq. 2.13 : } QY = \frac{f}{f + k_{nr}} \dots\dots\dots \text{p. 50}$$

$$\text{éq. 2.14 : } QY = \frac{f}{f + k_{nr} + q + FRET} \dots\dots\dots \text{p. 50}$$

### Chapitre 3

$$\text{éq. 3.1 : } P(k) = e^{-\lambda} \frac{\lambda^k}{k!} \dots\dots\dots \text{p. 62}$$

$$\text{éq. 3.2 : } P(k) = \binom{n}{k} \cdot p^k q^{n-k} \dots\dots\dots \text{p. 62}$$

$$\text{éq. S3.1 : } A_n = (K_a)^{n-1} A_1 = \left(\frac{\alpha'}{\beta}\right)^{n-1} A_1 \dots\dots\dots \text{p. 75}$$

$$\text{éq. S3.2 : } \text{prob}(x) = \frac{\langle x \rangle^x}{x!} \exp(-\langle x \rangle) = \frac{(Np^5)^x}{x!} \exp(-Np^5) \dots\dots\dots \text{p. 76}$$

### Chapitre 4

$$\text{éq. 4.1 : } P(N) = \sum_{k=0}^{\text{floor}(N/2)} \frac{N_{real}!}{(N-2k)!(k+N_{real}-N)!k!} p_{acc}^{N-2k} p_0^{k+N_{real}-N} p_2^k \quad \text{if } N < N_{real} \dots\dots\dots \text{p. 95}$$

$$\text{éq. 4.2 : } P(N) = \sum_{k=N-N_{real}}^{\text{floor}(N/2)} \frac{N_{real}!}{(N-2k)!(k+N_{real}-N)!k!} p_{acc}^{N-2k} p_0^{k+N_{real}-N} p_2^k \quad \text{if } N \geq N_{real} \dots\dots\dots \text{p. 95}$$

$$\text{éq. S4.1 : } N_{FF} = \left( \frac{1}{T-1} \sum_{i=1}^{T-1} [\delta I - \bar{I}_{FF}]^2 \right)^{1/2} \quad \text{with } \bar{I}_{FF} = \frac{I_T - I_1}{T-1} \dots\dots\dots \text{p. 108}$$

$$\text{éq. S4.2 : } N_{FF} = \sqrt{\langle \delta I^2 \rangle - \langle \delta I \rangle^2} \dots\dots\dots \text{p. 108}$$

$$\text{éq. S4.3 : } \chi_{fit}^2 = \sum_i \frac{(Exp_i - Ideal_i)^2}{var_i} \dots\dots\dots \text{p. 111}$$

éq. S4.4 :  $P_{bleach}(t) = (1 - e^{-t/\tau})$  .....p. 112

éq. S4.5 :  $P_{time}(n) = (1 - e^{-t/\tau})^n$  .....p. 112

éq. S4.6 :  $t = -\tau \cdot \ln(1 - P_{time}^{1/n})$  .....p. 112

éq. S4.7 :  $P_d(t) = \frac{d}{dt} P_{bleach}(t) = \frac{e^{-t/\tau}}{\tau}$  .....p. 113

éq. S4.8 : 
$$P_{miss}^1(\tau, \Delta t) = \sum_i \frac{n!}{2!(n-2)!} \left( \int_{t_i}^{t_i+\Delta t} \frac{e^{-t/\tau}}{\tau} dt \right)^2 \left( 1 - \int_{t_i}^{t_i+\Delta t} \frac{e^{-t/\tau}}{\tau} dt \right)^{n-2}$$
 .....p. 114  

$$= \sum_i \frac{n!}{2!(n-2)!} \left( e^{-t_i/\tau} (1 - e^{-\Delta t/\tau}) \right)^2 \left( 1 - e^{-t_i/\tau} (1 - e^{-\Delta t/\tau}) \right)^{n-2}$$

éq. S4.9 :  $P_{miss}^{k-1}(\tau, \Delta t) = \sum_i \frac{n!}{k!(n-k)!} \left( e^{-t_i/\tau} (1 - e^{-\Delta t/\tau}) \right)^k \left( 1 - e^{-t_i/\tau} (1 - e^{-\Delta t/\tau}) \right)^{n-k}$  .....p. 114

éq. S4.10 :  $P_{miss}(\tau, \Delta t) = \sum_{k=2}^n \left( \sum_i \frac{n!}{k!(n-k)!} \left( e^{-t_i/\tau} (1 - e^{-\Delta t/\tau}) \right)^k \left( 1 - e^{-t_i/\tau} (1 - e^{-\Delta t/\tau}) \right)^{n-k} \right)$  .....p. 114

## Chapitre 5

éq. 5.1 :  $\langle r^2 \rangle = 4Dt$  .....p. 133

éq. 5.2 :  $FRET = I_{488-705/80}^{DA} - I_{488-525/50}^{DA} \cdot leakDonor - I_{635-705/80}^{DA} \cdot leakAcceptor$  .....p. 133

éq. 5.3 :  $leakDonor = \frac{I_{488-705/80}^D}{I_{488-525/50}^D}$  .....p. 134

éq. 5.4 :  $leakAcceptor = \frac{I_{488-705/80}^A}{I_{635-705/80}^A}$  .....p. 134

éq. 5.5 : 
$$E = \frac{FRET / (QY_A \cdot CorrFiltA)}{FRET / (QY_A \cdot CorrFiltA) + I_{488-525/50M}^{DA} / (QY_D \cdot CorrFiltD)}$$
 .....p. 134

éq. 5.6 :  $r = R_0 \left( \frac{1-E}{E} \right)^{1/6}$  .....p. 134

## Chapitre 6

éq. 6.1 :  $SU_{obs}(k) = \sum_{n=k}^4 \left( \frac{\alpha \cdot [Cry1Aa]}{\beta} \right)^{n-1} A_1 \frac{n!}{k!(n-k)!} p^k (1-p)^{n-k}, k \in \{1; 2; 3; 4\} \dots\dots\dots p. 163$

éq. 6.2 :  $\langle k \rangle = \sum_{k=1}^4 k \left( \frac{SU_{obs}(k)}{\sum_{k=1}^4 SU_{obs}(k)} \right) \dots\dots\dots p. 163$

éq. 6.3 :  $\langle SU \rangle = \frac{1}{1 - \left(\frac{\alpha'}{\beta}\right)} - \frac{4 \left(\frac{\alpha'}{\beta}\right)^4}{1 - \left(\frac{\alpha'}{\beta}\right)^4} \dots\dots\dots p. 164$



*Appendice II*

**Curriculum vitae sommaire**

**Formation**

<b>Doctorat en physique</b>	depuis 2009
<b>Maîtrise en physique</b> orientation <b>biophysique et physiologie moléculaires</b> sous la supervision du Dr. Rikard Blunck ( <i>Université de Montréal</i> )	2007 - 2009
<b>Baccalauréat en physique</b> <i>Université Laval</i>	2004 - 2007

**Contribution à la recherche****Articles soumis**

**McGuire H**, Blunck R. (2014). Studying clustering of KcsA channels using single-channel voltage-clamp fluorescence imaging. *Nature Communications* (2014/07/07). 23 pages. NCOMMS-14-10185.

**Articles publiés**

Faure E, Starek G, **McGuire H**, Berneche S, Blunck R. (2012). A limited 4 Å radial displacement of the S4-S5 linker is sufficient for internal gate closing in Kv channels. *The Journal of Biological Chemistry*. 287: 40091-40098.

**McGuire H**, Arousseau MRP, Bowie D, Blunck R. (2012). Automating single subunit counting of membrane proteins in mammalian cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 287: 35912-35921.

Groulx N\*, **McGuire H\*** (\*co-premier auteur), Laprade R, Schwartz JL, Blunck R. (2011). Single molecule fluorescence study of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Aa reveals tetramerization. *The Journal of Biological Chemistry*. 286: 42274-42282.

Blunck R, **McGuire H**, Hyde HC, Bezanilla F. (2008). Fluorescence detection of the movement of single KcsA subunits reveals cooperativity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*. 105: 20263-20268.

**McGuire H**, Blunck R. (2009). Single-channel fluorescence spectroscopy to study conformational changes of ion channels. *Médecine/Sciences*. 25: 951-954.

**Chapitres de livre**

Arousseau MRP, **McGuire H**, Blunck R, Bowie D. (2014). Fluorescent Subunit Counting Of Membrane-Bound Proteins in Mammalian Cells. *Neuromethods*. Accepted (2014/09/11). Springer.

**Thèses**

**McGuire, H.** (2009). "Étude du couplage entre les sous-unités du canal potassique KcsA par des mesures de spectroscopie de fluorescence en canal unitaire", Université de Montréal, Mémoire de maîtrise, 99 pages



**Conférences**

**McGuire H.** (2013). Introduction à la biophysique. JARÉPUM 2013 (Journées annuelles de la recherche des étudiants en physique de l'Université de Montréal), Montreal, Canada (conférencier invité). Conférence institutionnelle.

**McGuire H,** Hyde C, Bezanilla F, Blunck R. (2009). Determining the coupling between subunits in KcsA using fluorescence spectroscopy. 53rd annual meeting of the biophysical society, Boston, USA. Conférence internationale

**Présentations par affiche**

McGuire H, Blunck R. (2014). Influence of lipid bilayer thickness on ion channels using single-channel voltage-clamp fluorescence imaging. 7th scientific day of the Groupe d'Étude des Protéines Membranaires (GEPRM), Montreal, Canada.

McGuire H, Blunck R. (2014). Influence of lipid bilayer thickness on ion channels using single-channel voltage-clamp fluorescence imaging. 58th annual meeting of the biophysical society, San Francisco, California, United States.

McGuire H, Aurousseau MRP, Bowie D, Blunck R. (2013). Automated Subunit Counting. XXVII GEPRM symposium, Montreal, Canada.

McGuire H, Aurousseau MRP, Bowie D, Blunck R. (2012). An automated method to study oligomerization of single membrane-bound protein using fluorescence imaging. 56th annual meeting of the biophysical society, San Diego, California, USA.

McGuire H, Aurousseau MRP, Bowie D, Blunck R. (2012). Automated Subunit Counting. Presentation for the annual meeting of the Groupe d'Étude des Protéines Membranaires (GEPRM) at Université de Montréal.

McGuire H, Blunck R. (2010). Towards simultaneous single channel current and fluorescence recordings in planar lipid bilayer. Presentation for the annual meeting of the Groupe d'Étude des Protéines Membranaires (GEPRM) at Université de Montréal.

McGuire H, Blunck R. (2010). Towards simultaneous single channel current and fluorescence recordings in planar lipid bilayer. Presentation for the McGill biophysical chemistry symposium.

McGuire H, Blunck R. (2010). Towards simultaneous single channel current and fluorescence recordings in planar lipid bilayer. 54th annual meeting of the biophysical society, San Francisco, California, USA.

McGuire H, Hyde C, Bezanilla F, Blunck R. (2009). Determining the coupling between subunits in KcsA using fluorescence spectroscopy. Presentation for the annual meeting of the Groupe d'Étude des Protéines Membranaires (GEPRM) at Université de Montréal.

McGuire H, Hyde C, Bezanilla F, Blunck R. (2008). Determining the coupling between subunits in KcsA using fluorescence spectroscopy. 52nd annual meeting of the biophysical society, Long Beach, California, USA.