

Université de Montréal

Étude structurale et fonctionnelle du canal potassium dépendant du voltage KvAP

par

Elise Faure

Département de Physiologie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de doctorat

en physiologie,

option biophysique et physiologie moléculaire

septembre 2014

© Elise Faure, 2014

RÉSUMÉ

Les canaux ioniques dépendants du voltage sont responsables de l'initiation et de la propagation des potentiels d'action dans les cellules excitables. De nombreuses maladies héréditaires (*channelopathies*) sont associées à un contrôle défectueux du voltage par ces canaux (arythmies, épilepsie, etc.). L'établissement de la relation structure-fonction exacte de ces canaux est donc crucial pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques spécifiques. Dans ce contexte, le canal procaryote dépendant du voltage et sélectif au potassium KvAP a servi de modèle d'étude afin d'approfondir i) le processus du couplage électromécanique, ii) l'influence des lipides sur l'activité voltage-dépendante et iii) l'inactivation de type *closed-state*.

Afin de pallier à l'absence de données structurales dynamiques du côté cytosolique ainsi que de structure cristalline dans l'état fermé, nous avons mesuré le mouvement du linker S4-S5 durant le *gating* par spectroscopie de fluorescence (LRET). Pour ce faire, nous avons utilisé une technique novatrice du contrôle de l'état conformationnel du canal en utilisant les lipides (phospholipides et non phospholipides) au lieu du voltage. Un modèle dans l'état fermé a ainsi été produit et a démontré qu'un mouvement latéral modeste de 4 Å du linker S4-S5 est suffisant pour mener à la fermeture du pore de conduction.

Les interactions lipides - canaux jouent un rôle déterminant dans la régulation de la fonction des canaux ioniques mais ne sont pas encore bien caractérisées. Nous avons donc également étudié l'influence de différents lipides sur l'activation voltage - dépendante de KvAP et mis en évidence deux sites distincts d'interactions menant à des effets différents : au niveau du senseur de voltage, menant au déplacement de la courbe conductance-voltage, et du côté intracellulaire, influençant le degré de la pente de cette même courbe. Nous avons également démontré que l'échange de lipides autour de KvAP est extrêmement limité et affiche une dépendance à l'état conformationnel du canal, ne se produisant que dans l'état ouvert.

KvAP possède une inactivation lente particulière, accessible depuis l'état ouvert. Nous avons étudié les effets de la composition lipidique et de la température sur l'entrée dans l'état inactivé

et le temps de récupération. Nous avons également utilisé la spectroscopie de fluorescence (*quenching*) en voltage imposé afin d'élucider les bases moléculaires de l'inactivation de type *closed-state*. Nous avons identifié une position à la base de l'hélice S4 qui semble impliquée à la fois dans le mécanisme responsable de ce type d'inactivation et dans la récupération particulièrement lente qui est typique du canal KvAP.

Mots-clés : canaux ioniques, Kv, KvAP, S4-S5 linker, senseur de voltage, lipides, couplage électromécanique, bicouche, spectroscopie de fluorescence en voltage imposé, LRET.

ABSTRACT

Voltage-gated ion channels are responsible for the initiation and propagation of action potentials in excitable cells. Several hereditary diseases (channelopathies) are associated with a defective voltage control by these channels, leading to arrhythmias, epilepsy, etc. Hence, establishing the exact structure/function relation for ion channels is crucial for the development of new specific therapeutic agents. Here, the bacterial voltage-gated potassium channel KvAP served as a model to study i) electromechanical coupling, ii) influence of lipids on the voltage dependent activity and iii) closed-state inactivation.

To overcome the lack of structural information on the cytosolic side and of crystal structure in the closed state, we determined the S4-S5 linker movement during gating using fluorescence spectroscopy (LRET). We were able to control the conformational state of the channels by using lipids (phospholipids and non phospholipids) instead of voltage clamp. Based on these experimental constraints, a model in the closed state was produced, showing that a small 4Å radial displacement of the S4-S5 linker is sufficient to close the conduction pore.

Interactions between lipids and membrane proteins play an important role in the regulation of ion channels activity but are not well characterized. We studied the influence of different lipids on KvAP voltage-dependent activation and showed two distinct effects related to different interactions sites: one bound to the voltage sensor, leading to a shift of the conductance-voltage curve, and another at the intracellular side near the pore region, affecting the steepness of this curve. We also showed that the exchange of lipids is very limited around KvAP and seems to be state dependent, occurring only when the channels are kept in the open state.

KvAP has a slow inactivation atypical, accessible from the open state. We studied the effects of lipid composition and temperature on entry into inactivation and recovery. We also used voltage-clamp fluorometry in bilayers to investigate closed-state inactivation molecular basis. We identified a position at the bottom of the S4 helix that seems involved in the mechanism

for slow inactivation and the extremely slow recovery from inactivation typically displayed by KvAP.

Keywords: ion channels, Kv, KvAP, S4-S5 linker, voltage sensor, electromechanical coupling, lipids, bilayer, voltage-clamp fluorometry, LRET.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	1
Mise en contexte	1
1.1 Réarrangements conformationnels du senseur de voltage	3
1.1.1 Origine de la sensibilité au voltage	3
1.1.2 Position de l'hélice S4 et stabilisation des charges de <i>gating</i>	5
1.1.3 Modèles mécanistiques idéalisés du mouvement du senseur de voltage	9
1.1.3.1 Le modèle du transporteur	9
1.1.3.2 Le modèle du helical screw ou sliding helix	10
1.1.3.3 Le paddle model	11
1.1.3.4 Points communs et différences	11
1.1.4 Le domaine senseur de voltage dans l'état au repos	12
1.1.5 Effet des lipides sur la conformation du domaine senseur de voltage	16
1.1.5.1 Rôle des groupements phosphate	16
1.1.5.2 Sites de liaison	19
1.2 Couplage électromécanique	20
1.2.1 Interactions entre le linker S4-S5 et S6C	20
1.2.1.1 Résidus impliqués	20
1.2.1.2 Découplage	22
1.2.1.3 Mode d'action	23
1.2.1.4 Closed-state inactivation	24
1.2.2 Interactions entre les hélices S4 et S5	25
1.2.3 Modèles énergétiques du couplage électromécanique	26
1.2.4 Modèles structuraux et prédictions	27
MÉTHODOLOGIE	30
2.1 Obtention de lipoprotéosomes à partir du canal KvAP purifié	30
2.1.1 Purification de KvAP	30
2.1.1.1 Expression hétérologue dans E. coli	30
2.1.1.2 Solubilisation des membranes	31
2.1.1.3 Chromatographie d'affinité pour ions métalliques immobilisés (IMAC)	31
2.1.2 Reconstitution de KvAP en vésicules	32
2.2 Mesures d'électrophysiologie	33
2.2.1 Bicouche planaire (<i>Black lipid membrane</i>)	33
2.2.1.1 Lipides utilisés pour la formation de bicouches	33
2.2.1.2 Fusion des vésicules et mesures en voltage imposé	33
2.3 Mesures de LRET en vésicules	36

2.3.1 Lanthanide-based Resonance Energy Transfer (LRET)	36
2.3.2 Marquage spécifique	38
2.3.3. Stratégie d'optimisation du signal	39
2.3.4 Acquisition des données	40
2.3.5 Détermination des distances entre les linkers S4-S5	40
A LIMITED 4 Å RADIAL DISPLACEMENT OF THE S4-S5 LINKER IS SUFFICIENT FOR INTERNAL GATE CLOSING IN KV CHANNELS	41
Résumé	42
Abstract	43
3.1 Introduction	44
3.2 Experimental procedures	46
3.2.1 Molecular Biology	46
3.2.2 Purification of KvAP dimers	46
3.2.3 Labeling	46
3.2.4 Channel reconstitution in lipid vesicles	47
3.2.5 Electrophysiology recordings	47
3.2.6 LRET measurements	47
3.2.7 Molecular Dynamics simulations	48
3.3 Results	50
3.3.1 KvAP dimers can be gated by the lipid environment	50
3.3.2 LRET reveals position of S4-S5 linker in both Closed and Open State	53
3.3.3 Atomistic model reveals closing of the pore by 3-4 Å displacement	55
3.4 Discussion	59
3.5 Conclusion	61
3.6 Acknowledgments	61
3.7 References	62
DO LIPIDS SHOW STATE-DEPENDENT AFFINITY TO THE VOLTAGE-GATED POTASSIUM CHANNEL KVAP?	65
Résumé	66
Abstract	67
4.1 Introduction	68

4.2 Experimental Procedures	70
4.2.1 KvAP channel purification and reconstitution in lipid vesicles	70
4.2.2 Electrophysiology recordings	70
4.3 Results	72
4.3.1 Limited exchange of annular lipids around KvAP	72
4.3.2 KvAP shows preferential affinity to DPhPC	78
4.3.3 DOTAP effect is titrated by negative charged phospholipids (POPG)	80
4.3.4 Access to the lipid binding site in Kv channels seems to be state-dependent	80
4.4 Discussion	83
4.5 Conclusions	88
4.6 Acknowledgements	88
4.7 References	89
CLOSED-STATE INACTIVATION OF KVAP AND NACHBAC	92
Abstract	93
Résumé	94
5.1 Introduction	95
5.2 Methods	97
5.2.1 Voltage-clamp fluorometry in lipid planar bilayer	97
5.2.2 Voltage-clamp fluorometry in cut-open configuration	97
5.3 Results and Discussion	99
5.3.1 Lipid dependence of the inactivation of KvAP	99
5.3.2 Temperature dependence of recovery from inactivation	102
5.3.3 Closed-state inactivation in KvAP	106
5.3.4 Closed-state inactivation in NaChBac	108
5.4 Conclusions	111
5.5 Acknowledgements	111
5.6 References	112
CONCLUSIONS	114
BIBLIOGRAPHIE	120

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 3.1:** Distances between opposite S4-S5 linkers
- Tableau 3.2:** Comparison of distances obtained with different acceptors
- Tableau 4.1:** Midpoint of activation ($V_{1/2}$) and steepness degree (V_S) of KvAP conductance-voltage relations (mV).
- Tableau 4.2:** Midpoint of activation ($V_{1/2}$) and steepness degree (V_S) of conductance-voltage relations of KvAP in function of time, temperature and state (mV)

LISTE DES FIGURES

- Figure 1.1:** Représentation d'un canal potassium dépendant du voltage
- Figure 1.2:** Crevasses aqueuses et concentration du champ électrique
- Figure 1.3:** Interactions stabilisantes des arginines de S4 de la structure cristalline de NavAb
- Figure 1.4:** Position des résidus impliqués dans le gating pour différentes protéines sensibles au voltage.
- Figure 1.5:** Structure secondaire d'un domaine senseur de voltage
- Figure 1.6:** Superposition des structures de Ci-VSD activé et au repos
- Figure 1.7:** Représentation schématique des interactions stabilisantes entre les têtes phosphatées des lipides de la membrane et des arginines de S4.
- Figure 1.8:** Contacts entre le linker S4-S5 et S6C impliquées dans le couplage électromécanique
- Figure 1.9:** Superposition des structure de NavAb et Kv1.2 à partir de leur VSD
- Figure 2.1:** Structure des divers lipides utilisés pour la formation de bicouches planaires
- Figure 2.2:** Structure du chélate de terbium
- Figure 2.3:** Recouvrement spectral de sondes utilisées pour les mesures de LRET
- Figure 2.4:** Construction d'un dimère de KvAP et optimisation du signal de LRET
- Figure 3.1:** KvAP dimer and response to lipid environment changes
- Figure 3.2:** S4-S5 linker movement during gating determined by LRET measurements
- Figure 3.3:** Closed state model satisfying LRET restraints
- Figure 4.1:** Conductance-voltage relations of KvAP in variable lipid conditions
- Figure 4.2:** Lack of exchange between vesicles and bilayer lipids and bulk effect of DOTAP on DPhPC vesicles
- Figure 4.3:** KvAP lower affinity for DOTAP and titration of its effects by POPG
- Figure 4.4:** State-dependent accessibility of lipid binding site
- Figure 4.5:** Model for lipid binding sites in KvAP
- Figure 5.1:** KvAP entry into inactivation is lipid-dependent
- Figure 5.2:** KvAP entry into inactivation can saturate
- Figure 5.3:** KvAP revised gating model

Figure 5.4: KvAP inactivation recovery is not highly temperature dependent

Figure 5.5: NaChBac expressed in *Xenopus laevis* oocytes is temperature sensitive

Figure 5.6: Closed-state inactivation with KvAP in bilayer

Figure 5.7: Closed-state inactivation with NaChBac in oocytes

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

Å : ångström (10^{-10} mètres)

Cd^{2+} : ion cadmium

Ci-VSD: domaine senseur de voltage isolé de la phosphatase *Ciona intestinalis*

CSI: *closed-state inactivation*

DOTAP: dioleoyl-triméthyl-ammonium-propane

DPhPC: diphytanoyl-glycéro-phosphocholine

e_0 : charge élémentaire

E: résidu glutamate

E. coli: *Escherichia coli*

F: résidu phénylalanine

FPLC: *fast protein liquid chromatography*

FRET: transfert d'énergie de résonance de type Förster

GV: courbe conductance en fonction du voltage

I: résidu isoleucine

K_V : canal potassium dépendant du voltage

L: résidu leucine

LB: bouillon lysogène (Luria-Bertani)

LRET transfert d'énergie de résonance basée sur des lanthanides

MDS: simulation de dynamique moléculaire

mg: milligramme

mL: millilitre

mM: millimolaire

ms: milliseconde

mV: millivolt

N: atome d'azote

nA: nanoampère
Na_v: canal sodium dépendant du voltage
nm: nanomètre
O: atome d'oxygène
pA: picoampère
PDB: *Protein Data Bank*
POePC: palmitoyl-oleoyl-glycéro-ethylphosphocholine
POPG: palmitoyl-oleoyl-glycéro-phosphoglycérol
POPE: palmitoyl-oleoyl-glycéro-phosphoéthanolamine
POPS: palmitoyl-oleoyl-glycéro-phosphosérine
pS: picoSiemens
p.s.i. : *pound per square inch*
PUFA: *polyunsaturated fatty acid*
PVP: proline-valine-proline
QV: courbe charges de *gating* en fonction du voltage
R: résidu arginine
RMSD: *root mean square deviation*
RPM: rotation par minute
S: résidu sérine
S1-S6: segments transmembranaires
S6C: partie C-terminale du segment transmembranaire 6
T: résidu thréonine
VSD: domaine senseur de voltage
Y: résidu tyrosine
μg: microgramme
μL: microlitre
μs: microseconde

Je dédie cette thèse à mes parents et à leur support inconditionnel

Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, Rikard Blunck, pour m'avoir toujours poussée à me dépasser, à travailler plus fort et à devenir une meilleure scientifique.

Je n'y serais jamais arrivée sans mes formidables collègues de travail, en particulier Mireille Marsolais et Hugo McGuire.

Je remercie aussi tout spécialement mon conjoint Gary, qui a toujours su me supporter et m'encourager dans les moments de doutes et de découragement.

INTRODUCTION

Mise en contexte

Les canaux ioniques sélectifs au potassium et dont l'activité est dépendante du voltage (K_v) forment un groupe de protéines membranaires régulant le flux d'ions potassium dans la cellule en fonction des changements de potentiel membranaire ressentis. Ces protéines jouent donc un rôle central au niveau de l'excitabilité neuronale, musculaire et cardiaque et sont notamment responsables du maintien du potentiel de repos dans les cellules, de la repolarisation de la membrane cellulaire suite à un potentiel d'action ainsi que de la fréquence à laquelle ceux-ci se produisent [1]. Plusieurs pathologies sont liées à des mutations survenant dans ces canaux et peuvent causer des désordres neurologiques, tels que l'ataxie épisodique de type 1 et l'épilepsie bénigne du nouveau-né, ou encore des arythmies cardiaques, comme le syndrome du long QT [2].

Les K_v forment des tétramères dont chaque sous-unité est composée de six (6) hélices alpha (α) transmembranaires (S1 à S6). Chaque sous-unité comprend un domaine senseur de voltage (VSD) formé des quatre premières hélices (S1-S4) alors que les deux dernières hélices (S5-S6) de chaque sous-unité s'assemblent collectivement pour former un pore central [1, 3-8] (Fig. 1.1). Les quatre domaines senseurs de voltage en périphérie sont reliés chacun au pore par une courte hélice alpha, le linker S4-S5. Lors d'un événement de dépolarisation membranaire, les quatre VSD subissent un changement conformationnel qui promeut l'ouverture et la fermeture du chemin de conduction ionique [1, 6, 9]. La conduction ionique à travers le pore peut être physiquement obstruée à 2 endroits distincts: au croisement interne des extrémités C-terminales des hélices S6 (*bundle crossing* ou *gate* d'activation) ainsi qu'au niveau du filtre de sélectivité, du côté externe [10-13]. Malgré un débit proche de la limite de diffusion, le pore demeure extrêmement sélectif aux ions potassium.

Les études marquantes de Hodgkin et Huxley sur l'axone de calmar géant publiées au début des années 50 [14], le clonage de canaux voltage-dépendants à la fin des années 80 [15-18] et la première structure cristalline d'un K_v au début des années 2000 [19] constituent des points

tournants dans ce domaine de recherche. Cependant, les mécanismes moléculaires qui sous-tendent la fonction des Kv ne sont pas tous encore élucidés.

L'ouverture du pore est contrôlée par le mouvement des senseurs de voltage, dans lesquels des acides aminés chargés positivement situés dans l'hélice S4 répondent aux changements ressentis de potentiel membranaire. Ce mouvement, initié électriquement, est transféré au domaine du pore et mène mécaniquement à l'écartement des hélices S6, via le linker S4-S5 [20], un processus nommé couplage électromécanique. Ces deux processus fondamentaux sont l'objet de cette introduction.

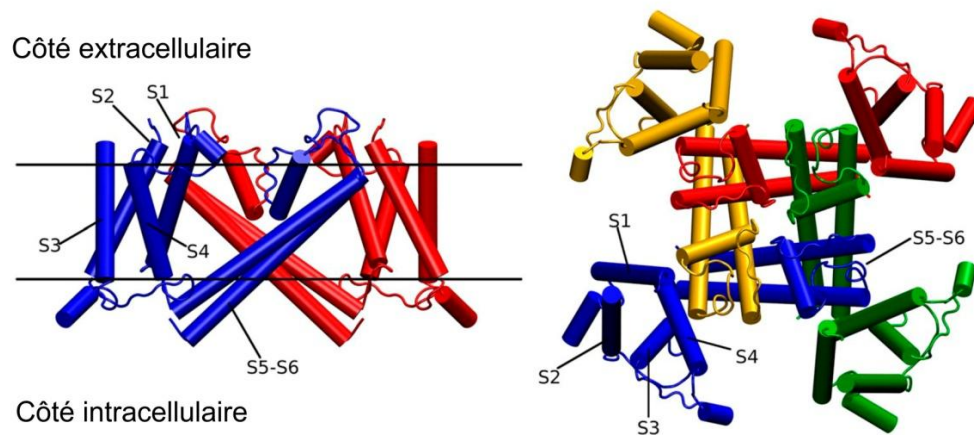


Figure 1.1. Représentation d'un canal potassium dépendant du voltage. Le domaine senseur de voltage (VSD) comprend les segments transmembranaires S1-S4 et le pore central est formé des hélices S5 et S6. Chaque sous-unité du tétramère est colorée différemment. À gauche, vue latérale de deux sous-unités opposées, et à droite, vue extracellulaire du canal. Structure du canal Kv1.2 (PDB 3LUT), figure adaptée de Vargas *et al*, JGP, 2012 ([21]).

1.1 Réarrangements conformationnels du senseur de voltage

Les réarrangements structuraux des domaines senseurs de voltage (VSD) ont été la source de nombreuses investigations et de débats. Cette section révisé brièvement les travaux et les stratégies expérimentales qui ont mené à la compréhension actuelle de leur fonctionnement.

1.1.1 Origine de la sensibilité au voltage

Le phénomène de bioélectricité qui régit tout organisme vivant est fascinant. Toute la signalisation électrique du système nerveux central repose sur la dépendance au voltage des canaux ioniques, fournie par les domaines senseurs de voltage (VSD) qui bougent chacun 3-3.5 charges élémentaires (12-14 e_0 au total) dans le champ électrique membranaire [22-24]. Les acides aminés responsables de cette grande quantité de charges dites de *gating* ont été identifiés en mesurant le mouvement total des charges par canal après que chaque résidu portant une charge (positive ou négative) ait été neutralisé un par un [25, 26]. Le motif particulier présent sur l'hélice S4, où de 4 à 7 résidus basiques sont séparés par 2 résidus hydrophobes, et son rôle probable dans le *gating* avaient déjà été mis en évidence [15-18, 27, 28], mais ces études ont précisé que les 4 résidus basiques de S4 situés du côté extracellulaire (R362, R365, R368 et R371 dans Shaker, R1 à R4 pour la suite) et que le résidu acide du côté intracellulaire de S2 (E293, E1) sont les principaux contributeurs au mouvement de charges de *gating* [25, 26, 29, 30]. En neutralisant par mutagenèse dirigée un seul de ces résidus, la charge totale par canal se réduit par plus des 4 e_0 attendus (compte tenu de l'assemblage tétramérique), indiquant que l'amplitude du mouvement (i.e. la distance franchie dans le champ électrique) n'est pas la même pour chaque résidu et/ou que le profil du champ électrique n'est pas ressenti uniformément [25, 26, 31]. Ce mouvement de charges crée un courant transitoire, le courant de *gating*, mesuré pour la première fois dans les canaux sodiques dans les années 70 [32-35].

De nombreuses études d'accessibilité à partir du milieu intracellulaire et extracellulaire en fonction du potentiel membranaire ont été effectuées afin de caractériser le mouvement des charges de *gating*. Les arginines du canal Kv eucaryote Shaker ont été remplacées soit par des cystéines soit par des histidines, et des réactifs au groupement thiol ou des protons ont été

utilisés comme sondes. Les résultats obtenus ont montré que les arginines de l'hélice S4 passent d'une exposition intracellulaire à extracellulaire lorsque la membrane est dépolarisée [36-43]. L'alternance de l'accessibilité est une indication directe que les résidus porteurs des charges de *gating* résident en milieu aqueux et ce, dans les deux états conformationnels (au repos et activé) du senseur de voltage [31]. Fait intéressant, les résultats varient selon la technique utilisée: les 4 arginines changent d'exposition lorsque remplacées par des histidines alors que dans le cas des mutations cystéines, les extrémités (R362 et R371) demeurent inaccessibles et ne traversent pas au complet. Cette différence s'explique si les arginines sont situées dans des crevasses aqueuses étroites qui se rétrécissent vers l'intérieur de la protéine. Le fait que le champ électrique ne soit pas ressenti de façon égale sur les charges de *gating* vient appuyer l'existence de ces crevasses pénétrantes [44].

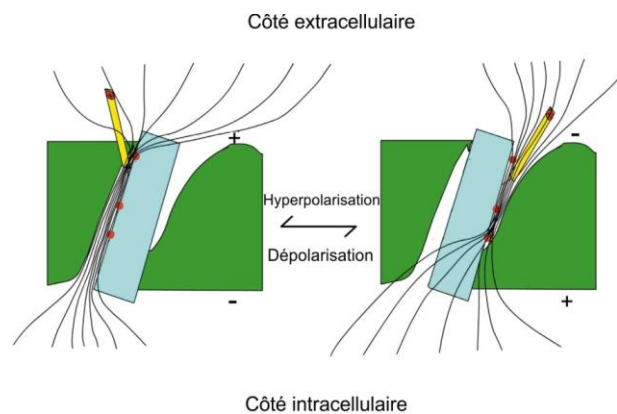


Figure 1.2. Crevasses aqueuses et concentration du champ électrique. Représentation schématique de l'hélice S4 (bleu clair) et des charges de *gating* (points rouges) en condition hyperpolarisante (à gauche) et dépolarisante (à droite). L'orientation du fluorophore Di-1-ANEPIA (en jaune) dépend du potentiel membranaire et de la concentration du champ électrique (lignes noires) dans les crevasses aqueuses le long de S4. Figure adaptée de Asamoah *et al. Neuron*, 2003 ([45]), avec la permission de Elsevier.

En remplaçant les arginines R362 ou R371 du canal Shaker par une histidine, un canal à protons se forme en condition hyperpolarisante ou dépolarisante, respectivement [36, 37, 46]. Ces observations, en plus d'indiquer que les crevasses intra et extracellulaires rentrent profondément dans la membrane et sont très rapprochées l'une de l'autre (espacées seulement

par un résidu histidine), impliquent également que le champ électrique est très concentré autour de ces résidus [31, 46].

L'utilisation d'une sonde fluorescente sensible au potentiel électrique (Di-1-ANEPIA) confirme la concentration du champ électrique autour du deuxième résidu chargé de S4 (estimé à 5 fois supérieur à celui de la bicouche lipidique) et montre que ce champ est dynamique et change en fonction du potentiel appliqué [45] (voir Fig.1.2). La distance sur laquelle le champ électrique est concentré (*focused*) dans le VSD de Shaker est estimée à 4-8 Å [44, 47] et les crevasses aqueuses sont effectivement séparées par une très mince cloison [45-51].

1.1.2 Position de l'hélice S4 et stabilisation des charges de *gating*

La stabilisation d'une hélice chargée à l'intérieur d'une membrane lipidique ne va pas de soi. En effet, comment expliquer que des charges électriques ponctuelles soient stabilisées et déplacées dans un milieu présentant une constante diélectrique aussi faible que celle de la membrane cellulaire? Ceci suggère que les arginines soient orientées de façon spécifique dans le VSD [52]. Dès les années 90, il a été démontré que les charges de *gating* s'arrêtent à des endroits discrets lors de leur déplacement dans la membrane [40, 53-55] et que la stabilisation des arginines de l'hélice S4 s'effectue via des interactions électrostatiques séquentielles avec des résidus glutamate et aspartate situés dans les hélices voisines [28, 56-58].

La structure du VSD isolé du canal KvAP [19], un Kv d'origine procaryote, montre que S1, S2 et S4 sont des hélices ininterrompues alors que S3 est composée de 2 courtes hélices. À l'exception de l'hélice S3, continue chez les autres Kv, cette structure est en accord général avec les études de scan systématique (remplacement de chaque résidu par un tryptophane ou une alanine) menées sur des Kv eucaryotes [59-62]. Par contre, la structure du canal complet soulève des doutes sur l'état natif. Une structure en épingle à cheveux (hélice-tour-hélice) formée par S4 et la partie C-terminale de S3 (S3b) prend le nom de *paddle*. Cette première structure tridimensionnelle d'un VSD localise S4 en périphérie du canal et pointe les arginines face au cœur hydrophobe de la membrane. Il a donc été débattu s'il est possible, énergétiquement parlant, qu'une hélice chargée comme S4 puisse se stabiliser dans une bicouche avec les arginines faisant face aux lipides. Des simulations numériques ont montré

que des interactions substantielles avec un milieu hydrophobe tel que celui de la membrane exige une quantité élevée d'énergie de solvation et produit des constantes de temps d'activation plus lentes que celles observées expérimentalement [63]. Par contre, d'autres simulations de dynamique moléculaire sont favorables à cette possibilité [64-66], entre autre grâce à un réseau de ponts hydrogène entre les molécules d'eau et les groupements phosphate à proximité de l'hélice chargée, ainsi qu'à une déformation de la membrane réduisant son épaisseur à 10 Å [66].

Cependant, la formation spontanée de ponts disulfures et de sites de liaison au Cd^{2+} entre S4 et le pore d'une sous-unité adjacente située plutôt S4 à proximité du pore, possiblement dans la cavité entre deux sous-unités adjacentes [67-69]. Ces informations fournissent des contraintes pour un modèle où l'hélice S4 est beaucoup moins exposée aux lipides que dans la structure cristalline, et plutôt entourée des autres hélices du VSD [70]. Des mesures d'exposition aux lipides du VSD de KvAP par EPR (*electron paramagnetic resonance*) évaluent ces deux modèles contradictoires sur la position de S4 [71]. Celles-ci déterminent qu'une bonne portion de S3 est exposée au milieu aqueux (crevasses), que S1 est entourée par des parties du canal (VSD et pore) et surtout, que S4 se situe à l'interface lipides-protéine. Peu après, des mesures de transfert d'énergie de résonance (LRET et FRET) viennent appuyer la position de S4 en confirmant un léger déplacement de celle-ci durant le *gating* [72, 73]. Les structures de cinq canaux ioniques différents comportant un VSD ont été déterminées à ce jour: KvAP, Kv1.2 (et sa chimère), MlotiK, NavAb et NavRh [4, 19, 74-77]. Ces structures confirment que S4 est partiellement accessible aux lipides, mais que la surface chargée est dirigée vers les autres hélices du VSD.

Une série de modèles structuraux illustre un réseau d'interactions ioniques et de ponts hydrogène qui stabilisent les arginines durant leur mouvement de *gating* [51, 78]. Des interactions séquentielles dépendantes de l'état du VSD entre les charges de *gating* de S4 et les résidus négatifs de S1-S3 ont été précisées par des études de formation de ponts disulfure (*cross-linking*) et des modélisations numériques [51, 78-82]. Ces dernières, ainsi que la récente structure cristalline d'un canal Na_v (NavAb), ont mis en évidence un réseau de liens ioniques, d'interactions hydrophiles et de ponts hydrogènes ainsi qu'un noyau conservé électronégatif (ENC) du côté extracellulaire et du côté intracellulaire (INC) qui servent de

partenaires stabilisants pour les arginines de S4 [51, 75] (voir Fig.1.3). Les charges bougent dans ce pore de *gating*, dont la partie la plus étroite est occupée par un site de constriction hydrophobe (HCS) formé de plusieurs résidus hydrophobes conservés situés dans les hélices S1 à S3 qui empêchent le passage des ions.

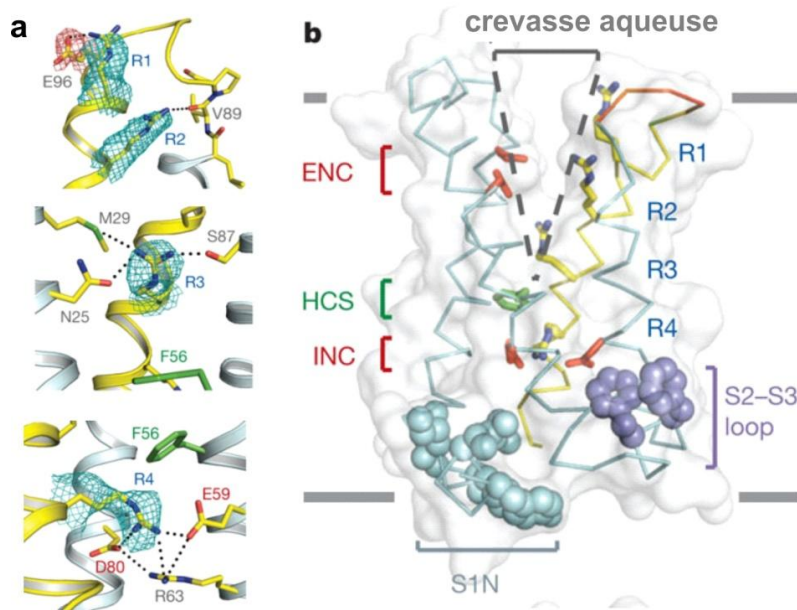


Figure 1.3. Interactions stabilisantes des arginines de S4 de la structure cristalline de NavAb. (a) Ponts hydrogène formés par les charges de *gating* et des résidus de S1-S3 sur une distance de 3.5 Å et moins (représentées par les lignes pointillées). (b) Vue de côté du VSD mettant en évidence le noyau électro-négatif du côté extracellulaire (ENC) et intracellulaire (INC), ainsi que le site de constriction hydrophobe (HCS). Les chaînes latérales des résidus importants sont représentées. Les atomes N et O bleu et rouge, respectivement. Figure adaptée de Payandeh *et al.* *Nature*, 2011 ([75]), avec la permission de NPG.

La même disposition se retrouve à la fois chez les Kv, les Nav et même chez le VSD de la phosphatase *Ciona intestinalis*. La cristallisation récente de son VSD isolé (Ci-VSD) dans l'état activé montre également la stabilisation des charges de *gating* par un réseau de liens hydrogènes et d'interactions ioniques avec des contre-charges localisées dans S1 et S3. La seule différence notable est l'absence de contre-charge dans S2, ce qui démontre une hétérogénéité dans le mécanisme de transfert de charges au travers des différents VSD [83].

Un centre de transfert de charges de *gating* dans le VSD facilite le mouvement de cette grande quantité de charges dans la membrane. Ce centre consiste en un résidu phénylalanine conservé

situé sur l'hélice S2 (F233 dans la chimère Kv1.2/2.1) et de deux résidus chargés négativement qui interagissent avec une charge positive. Le "couvercle" rigide formé par le cycle aromatique de la phénylalanine protégerait un site de liaison cationique responsable de la catalyse du transfert des charges de *gating* [84]. L'équivalent du bouchon hydrophobe [79] ou du centre de transfert [84] chez Ci-VSD est l'alignement remarquablement droit des quatre arginines (Fig.1.4). Un groupe de trois résidus hydrophobes (deux isoleucines et une phénylalanine) dans le même plan semi-circulaire sert de barrière diélectrique aux ions et aux molécules d'eau [83].

Le positionnement des charges de *gating* diffère remarquablement entre différents canaux et enzymes voltage-dépendants. Elles se localisent selon une forme arquée le long de l'hélice S4, KvAP ayant l'arc le plus étendu et Ci-VSD, le plus restreint (voir Figure 1.4). La position des contre-charges de stabilisation est influencée en conséquence. De ce fait, la comparaison directe d'information structurale à travers différents VSD doit se faire avec précautions.

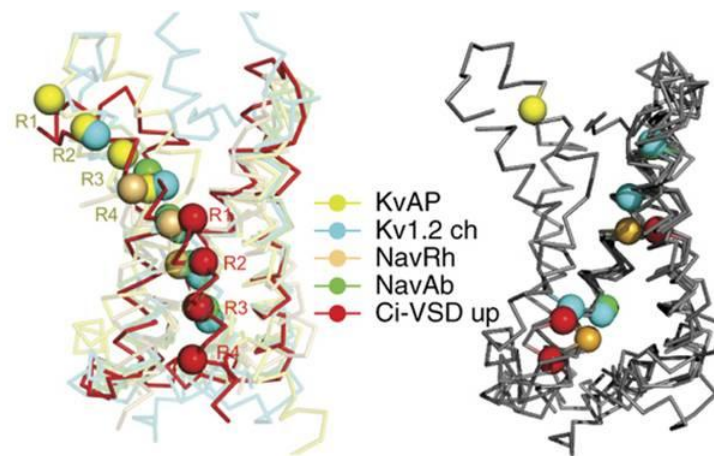


Figure 1.4. Position des résidus impliqués dans le gating pour différentes protéines sensibles au voltage. À gauche, superposition des positions des charges de *gating* (R1 à R4) pour des Kv (KvAP et la chimère Kv1.2/2.1), des Nav (NavRh et NavAb) et Ci-VSD selon le code de couleurs indiqué. À droite, position des contre-charges stabilisatrices correspondantes. Figure adaptée de Li *et al*, *NSMB*, 2014 [83], avec la permission de NPG.

1.1.3 Modèles mécanistiques idéalisés du mouvement du senseur de voltage

Des modèles cinétiques avec des états discrets ont été développés pour décrire le *gating* de Shaker [53, 54, 85]. Les changements conformationnels du VSD précédant l'ouverture du pore peuvent être divisés en deux phases. Suite à la dépolarisation, les quatre senseurs de voltage bougent d'abord indépendamment l'un par rapport à l'autre, et c'est à cette phase que sont reliés les deux mouvements de charges majeurs [22, 53, 86-88]. Ensuite, lorsque les quatre hélices S4 sont dans leur conformation activée, un mouvement concerté (ou coopératif) se produit ensuite où les quatre senseurs bougent en même temps (état "pré-ouvert"), menant à l'ouverture du pore [54, 85, 89-91]. Ces étapes décrivent le passage du VSD entre l'état dit au repos et celui dit activé. La transition entre les deux conformations s'effectue rapidement, mais l'état activé serait instable, et peu après le VSD relaxerait dans un état d'énergie plus basse, de façon indépendante du voltage. Cet état relaxé est proposé comme une troisième conformation majeure du VSD. L'hélice S4 bougerait comme une hélice 3_{10} entre l'état au repos et activé, et se convertirait en hélice alpha en relaxant. Cet état étant plus stable, c'est celui qui serait capturé dans les structures cristallines [92]. Même si les preuves que S4 est au moins partiellement en contact avec les lipides se sont accumulées [4, 60, 71, 93-97], la détermination de l'amplitude de son mouvement dans la membrane durant ces transitions conformationnelles a été le sujet de nombreuses études, parfois contradictoires.

1.1.3.1 Le modèle du transporteur

Une des implications de la concentration du champ électrique aux extrémités rétrécies des crevasses aqueuses est que la translocation des charges de *gating* ne requiert pas un grand mouvement. Des changements conformationnels dépendants du voltage et corrélés aux courants de *gating* dans la région extracellulaire de S4 ainsi que de S2 ont été observés grâce à des sondes fluorescentes sensibles au changement d'environnement (*quenching*) [98, 99]. Ces observations confirmaient à l'époque l'existence de réarrangements conformationnels liés au *gating* mais ne répondaient pas à la question de l'étendue du mouvement. Des mesures de distances ont été effectuées par transfert d'énergie de résonance (FRET et LRET) en différents endroits du canal Shaker, notamment sur l'hélice S4 et la boucle S3-S4 [100-102]. Malgré des variations de valeurs absolues des distances obtenues, celles-ci montrent toutes que les

changements de distance liés au *gating* sont petits et ne dépassent pas 5 Å. De ces premières observations directes du mouvement du senseur de voltage, un modèle simple de rotation sur place est proposé, où l'hélice S4 effectue une rotation sur elle-même pour exposer alternativement les quatre premiers résidus basiques à une crevasse interne en condition hyperpolarisante, et externe en condition dépolarisante [6, 101]. Un modèle équivalent est aussi suggéré pour les canaux sodiques [38].

Le modèle du transporteur tel que proposé au début des années 2 000 est une version évoluée de ce modèle de translocation de charges. Selon ce modèle, les charges de S4 lorsque le VSD est au repos seraient situées dans une crevasse en contact avec la solution intracellulaire. Durant l'activation, les charges de S4 bougeraient dans une autre crevasse, cette fois connectée avec la solution extracellulaire. Ce changement d'exposition ne requerrait qu'un léger *tilt* et une rotation de S4 sur son propre axe comme mouvements. Le mécanisme de *voltage-gating* serait ainsi principalement un réarrangement du champ électrique transmembranaire ainsi qu'une restructuration des crevasses aqueuses permettant aux charges de bouger d'une crevasse à l'autre [31, 46, 72, 73, 103-105]. Ce modèle implique un mouvement vertical de S4 très réduit (seulement 2-3 Å). Une amplitude de mouvement correspondante a effectivement été mesurée par transfert d'énergie de résonance (FRET) entre un donneur attaché au VSD et l'ion lipophile dipicrylamine (DPA) comme accepteur dans la membrane [73]. Des mesures de LRET entre une toxine de scorpion liée au pore et le VSD ont également indiqué un déplacement vertical dans la membrane de 2 Å et supportent un modèle où la protéine détermine le profil du champ électrique [72].

1.1.3.2 Le modèle du helical screw ou sliding helix

Dans ce modèle, S4 effectue une rotation sur son propre axe ainsi qu'une translation verticale par rapport au plan de la membrane plus conséquente que dans le modèle précédent [106, 107]. Le degré de rotation et de translation verticale varie selon les différentes versions du modèle. Dans celui originalement formulé, S4 tourne de 60° sur son axe et bouge de 4.5-5 Å vers le côté extracellulaire [27, 28]. La rotation accompagnant la translation implique que les arginines gardent toujours la possibilité de former des ponts salins avec les résidus négatifs présents dans d'autres hélices.

En 1996, une série d'articles publiés dans *Neuron* suggéraient un modèle "canaliculi," ou "sliding helix", dans lequel les charges de S4 sont isolées du milieu hydrophobe de la membrane en étant entourées des autres hélices du VSD. S4 bougerait dans cette "gaine" protéique, créant un "pore de gating" aqueux en formant des paires ioniques séquentielles [38, 41, 43, 108].

Le modèle du *helical screw* s'est modifié en fonction d'observations plus récentes. Afin de mieux correspondre aux observations de changements d'exposition aux solutions internes et externes, aux simulations de dynamique moléculaire et aux analyses de FRET, l'hélice S4 bougerait de 13 Å selon l'axe vertical et effectuerait une rotation de 180°. [107, 109-112]. L'hélice S4 serait aussi légèrement inclinée dans la membrane (*tilt*) afin de correspondre aux structures cristallines de Kv1.2 et de la chimère Kv1.2/2.1 [4, 74].

1.1.3.3 Le paddle model

Ce modèle est basé sur la structure cristalline de KvAP, où S4 et S3b forment une structure rigide. Ce modèle prédit le déplacement du *paddle* sur une grande distance, traversant la bicouche durant les transitions repos-activé, tel un "cation hydrophobe" attaché à des leviers [94]. La distance de 15 à 20 Å a été déterminée entre autre par des mesures d'accessibilité de l'avidine à la biotine liée au VSD par des linkers de différentes tailles [113]. Au repos, S4 serait située loin dans la membrane, près de l'interface avec la solution intracellulaire, et S3 serait au-dessus de S4. Lors de la dépolarisation, S3 et S4 se déplaceraient ensemble vers la membrane externe. Outre l'ordre de grandeur de la distance parcourue, une différence fondamentale par rapport aux autres modèles est l'exposition directe des arginines de S4 aux lipides et ce, dans les deux conformations. Un modèle antérieur avait déjà suggéré la translocation complète de S4 avec exposition aux lipides, mais impliquait le déroulement partiel de S4 [25].

1.1.3.4 Points communs et différences

Dans ces 3 modèles mécanistiques, aucune des arginines R1 ne traverse complètement la membrane (30-32 Å d'épaisseur). R2 et R3 doivent donc traverser le champ électrique au complet pour rendre compte des 3.2 charges de *gating* par sous-unité. Ceci implique que les 3 modèles requièrent une certaine focalisation du champ électrique dans la membrane: très

importante dans le modèle du transporteur, intermédiaire dans celui du *helical screw* et plutôt faible pour le *paddle model*. L'étendue de l'exposition aux lipides de S4 varie beaucoup. Les modèles du transporteur et du *helical screw* acceptent qu'environ un tiers de la circonférence de S4 y soit exposé, en pointant toutefois les arginines vers un environnement polaire, alors que dans le *paddle model*, la majorité des hélices S3 et S4 est en contact avec les lipides, incluant les arginines [114]. La divergence la plus flagrante demeure l'étendue du mouvement de S4, grand et transmembranaire dans un cas, plus modeste et défini par les crevasses et le champ électrique dans l'autre. Ces deux visions peuvent-elles être conciliées?

1.1.4 Le domaine senseur de voltage dans l'état au repos

Près d'une dizaine de structures cristallines de canaux ioniques dépendants du voltage ont été résolues, cependant toutes présentent un VSD dans l'état activé (ou relaxé) [4, 19, 74, 75, 84, 95, 115-117]. L'absence de structures dans l'état au repos a motivé de nombreuses études computationnelles afin de reconstituer cette conformation en 3D et à haute résolution. La superposition de tous ces modèles produits par différentes approches révèlent un début de consensus sur le mécanisme du *gating* voltage-dépendant tout en satisfaisant la plupart des données expérimentales [21, 118].

Les premiers modèles de l'état au repos du VSD indiquent une rotation de 180° de S4, un mouvement vertical de 6.5 Å au niveau de R1, et un mouvement d'inclinaison (*tilt*) par rapport à la membrane [119, 120]. Ces modèles prévoient la proximité de paires de résidus dans des hélices différentes qui sont vérifiées expérimentalement par des mesures de *cross-linking* et de ponts métal [79]. Ces modèles sont par la suite raffinés, entre autre avec des simulations tout atome [121], des algorithmes haute résolution de Rosetta Membrane [51] et surtout, en imposant des distances inter-résidus obtenues expérimentalement [51, 119, 122-124] et/ou en modélisant explicitement les chaînes latérales des résidus impliqués dans les différents ponts métaux ou disulfure [118, 124]. Ces contraintes expérimentales sont majoritairement fournies par la formation de ponts métal via le cadmium entre S1 et S4 et S2 et S4 [79], via le magnésium entre S2 et S3 [125] ainsi que par la formation d'interactions électrostatiques entre R1 et E2 [84]. Tous ces modèles ont en commun une rotation et une translation verticale de S4 sur son propre axe, alors que S1 et S2 restent stationnaires. La valeur absolue du déplacement

vertical de S4 est estimée à 10 Å au niveau de R1, avec une erreur de 3-4 Å reliée aux fluctuations structurales et à la flexibilité du VSD, autant dans les structures cristallines de l'état activé que dans les modèles de l'état au repos [21] (voir Fig.1.5). R1 se situe entre les chaînes latérales acides de E1 et E2 et au-dessus d'une phénylalanine très conservée au milieu de S2. Toutes les charges de gating de S4 sont orientées de façon à former des ponts salins avec les résidus négatifs de S1 et S3 ou interagissent avec le milieu aqueux ou des groupements polaires. Des conclusions semblables sont obtenues avec des modèles de canaux Nav [51, 78, 80, 81].

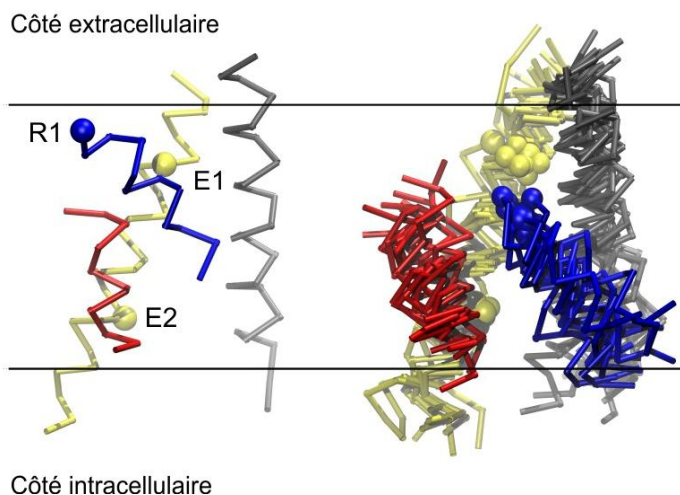


Figure 1.5. Structure secondaire d'un domaine senseur de voltage. À gauche, le VSD de Kv1.2 est dans l'état activé (PDB 3LUT, [116]). À droite, la superposition de modèles dans l'état au repos obtenus par différents groupes ([118, 123, 126, 127]) montre un consensus émergent sur le mouvement de l'hélice S4 (en bleu). Les 4 hélices d'un VSD sont représentées: S1 (gris), S2 (jaune), S3 (rouge) et S4 (bleu). Les sphères représentent les atomes C α des charges R1 (R294 sur S4), E1 et E2 (E226 et E236, sur S2, numérotation de Kv1.2). La déviation standard (RMSD) de la superposition des atomes des différents modèles est de 3-4 Å. Figure adaptée de Vargas *et al.* *JGP*, 2012 [21].

À ce stade, même si ce modèle consensus s'accorde avec les résultats bruts d'expériences d'accessibilité avidine/biotine ayant contribué au modèle du *paddle* [113], la structure du *paddle* lui-même ne peut pas être conservée [118]. De plus, une étude de *cross-linking* entre

S3 et S4 montre que ces deux hélices peuvent bouger l'une par rapport à l'autre, et ne forment pas un corps rigide [82]. La translation verticale du modèle consensus est plus importante que celle prédite par le modèle du transporteur. Les distances de ce modèle ont été majoritairement déterminées par des mesures de spectroscopie de fluorescence où des sondes sont attachées via des linkers à un site d'intérêt; l'approximation de la longueur de ces linkers a pu engendrer une erreur sur la distance finale

Plusieurs structures cristallines et MDS suggèrent que l'hélice S4 pourrait adopter une conformation hélicale 3_{10} [51, 74-77, 92, 117, 118, 121, 128, 129]. Un concept de transition séquentielle vers une conformation 3_{10} en tout ou en partie de S4 lorsqu'elle bouge à travers la région la plus hydrophobe du VSD est proposé, mais requiert plus de validation expérimentale [51, 78, 80, 121, 126]. Il est suggéré que S4 prenne une conformation 3_{10} spontanément au repos ou durant l'activation afin de mieux positionner les arginines avec les résidus négatifs des autres hélices, et qu'elle relaxe ensuite en conformation alpha [76, 92, 130, 131]. Les arginines situées le long d'une hélice 3_{10} seraient alignées linéairement, favorisant un pairage ionique séquentiel. La structure cristalline de NavAb dans l'état pré-ouvert indique une conformation 3_{10} entre R1 et R4. Les auteurs suggèrent que cette conformation emmagasine l'énergie de la translocation des arginines lors de l'activation, pour la relâcher lors de l'ouverture du pore [75].

Le récent essai de cristallisation du VSD isolé au repos de la phosphatase *Ciona intestinalis* (Ci-VSD), malgré une faible résolution, a permis d'en déduire un modèle où on y mesure un déplacement de 5Å de chaque charge de *gating*, incluant R0, ainsi qu'une rotation dans le sens horaire de 60° [83] (Fig.1.6). Contrairement aux structures présentées pour les canaux ioniques, l'hélice S4 ne présente aucun changement de structure secondaire.

L'idéal serait de pouvoir visualiser dans le temps atome par atome comment le canal répond au changement de potentiel. Il est maintenant possible de simuler l'effet d'un potentiel hyperpolarisant sur la structure à partir de l'état activé et d'observer les réarrangements [127, 132-134]. À partir de la structure de la chimère Kv1.2/2.1 [74] et en appliquant un potentiel hyperpolarisant, une MDS tout atome montre que S4 bouge verticalement d'environ 15 Å en étapes séquentielles et en tournant de 120° sur son axe. Le mouvement de S4 s'effectue dans

une cavité formée de S1 et S3, qui demeurent stationnaires, et un résidu isoleucine sépare les deux crevasses aqueuses durant le *gating* [127]. Cette série de pauses de S4 le long de son axe vertical est associée à des états multiples au repos du VSD, observés aussi lors d'analyses de formation successive de ponts métal [124] et de ponts disulfure entre les charges de S4 et des partenaires ioniques dans S2 et S3 [51, 78, 80].

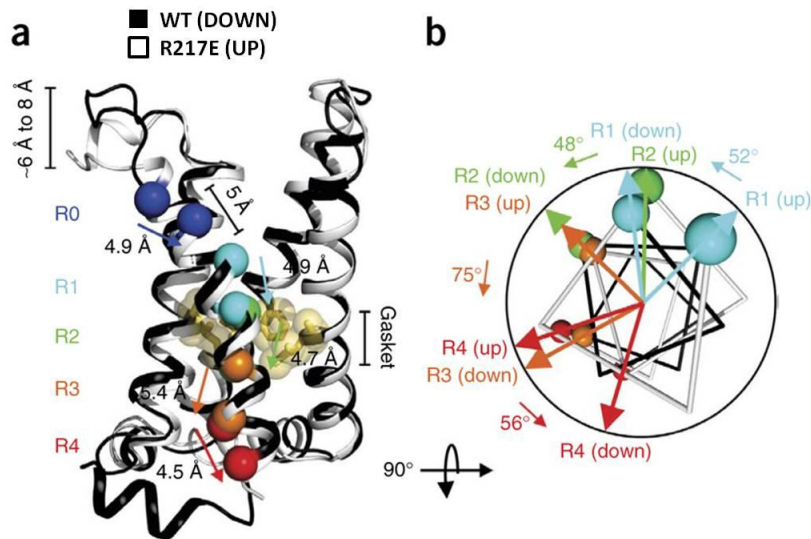


Figure 1.6. Superposition des structures de Ci-VSD activé et au repos. a) Lors de la transition vers l'état activé, les charge de *gating* (R0 à R4) glissent vers le haut sur une distance de 4.5 à 5.4 Å. Le C α de chaque R de la conformation activée prend la place du suivant dans l'état au repos. Ni le bouchon hydrophobe (*jaune pâle*) ni les contre-charges de stabilisation ne bougent significativement. b) La projection hélicale vue du côté extracellulaire de chaque C α des charges de *gating* (R) montre une rotation horaire allant de 48° à 75°. Figure adaptée de Li *et al*, *NSMB*, 2014 [83], avec la permission de NPG.

Le modèle qui conviendrait le mieux aux réarrangements conformationnels du VSD serait donc celui du *helical screw*: les arginines ne font pas face aux hydrocarbures des lipides et la formation séquentielle de ponts salins impliquant les charges de *gating* joue un rôle important. La concentration du champ électrique sur une région étroite de la bicouche est confirmée, mais S4 bouge bel et bien verticalement et ne subit pas un simple réarrangement de ce champ [21]. Le modèle actuel serait donc un mélange entre ceux du *sliding helix* et du transporteur: le mouvement vertical de S4 est moins prononcé que prédit, mais avec une inclinaison plus importante, ainsi qu'une rotation permettant l'alternance de l'accessibilité de certains résidus entre les solutions interne et externe.

1.1.5 Effet des lipides sur la conformation du domaine senseur de voltage

Différents essais de cristallisation du canal KvAP ont démontré que la présence de lipides est nécessaire à l'obtention d'une conformation native [19, 71, 95] et les structures cristallines de la chimère Kv1.2/2.1 ainsi que des canaux sodiques NavAb et NavRh ont révélé la présence de lipides à l'interface entre les VSD et le pore ainsi qu'entre VSD adjacents [74, 75, 77, 117]. En plus d'être essentiels à leur intégrité structurale, les lipides exercent une forte influence sur la fonction des Kv, favorisant ou inhibant leur activité [135-145]. Malgré le lien étroit qui existe entre les canaux dépendants du voltage et la membrane dans laquelle ils sont insérés, il y a peu de données sur les interactions lipides-canal et leur spécificité relative.

1.1.5.1 Rôle des groupements phosphate

L'hélice S4 est fortement exposée aux lipides, et ses deux résidus arginines les plus extracellulaires (R1 et R2) pointent vers le milieu lipidique environnant [4, 71, 74, 94, 95, 113, 146-148]. Cette orientation particulière offre la possibilité de former des interactions avec les groupements phosphate des lipides. Plusieurs simulations de dynamique moléculaire (MDS) ont effectivement mis en évidence des interactions rapprochées entre S4 et les lipides [48-50, 66, 128, 132, 149, 150]. Ces simulations, en plus de confirmer l'existence de crevasses aqueuses jusqu'au centre du VSD, montrent que chaque résidu chargé de S4 serait impliqué dans la formation de ponts hydrogène avec des molécules d'eau pénétrant extensivement le VSD [151]. Les résidus des VSD sont à la fois bien hydratés et à proximité des lipides, montrant des interactions à la fois avec les groupements fonctionnels et les chaînes aliphatiques [152, 153]. L'insertion du VSD dans la membrane causerait un certain remodelage de celle-ci, dont un amincissement allant de 3 à 10 Å [153, 154]. Cette déformation localisée, causée entre autre par les interactions entre S4 et les phospholipides, pourrait avoir un effet avantageux sur le focus du champ électrique [50, 155].

Plusieurs études d'électrophysiologie suggèrent la formation d'interactions stabilisantes entre les groupements phosphate des lipides et les arginines R1 et R2 de S4 [137, 138, 140]. L'ajout extracellulaire d'une lipase, la sphingomyélinase D (SmaseD), provoque l'hydrolyse de la sphingomyéline et laisse un produit anionique dans la membrane, le céramide-1-phosphate. On observe alors une stabilisation marquée de l'état activé des VSD, qui pourrait découler

d'interactions renforcées entre les arginines chargées positivement de S4 et le nombre accru de groupements phosphate chargés négativement [136]. La liaison préalable de toxines de tarentule (hanatoxine) aux senseurs de voltage inhibe l'action de la lipase [147, 148], suggérant qu'une très grande proximité soit requise entre les produits chargés et les VSD pour exercer un effet. L'existence d'une interaction spécifique avec le canal est confirmée par la perte de l'effet de SmaseD lorsque la séquence du motif du *paddle* est retirée [145]. De plus, seules certaines familles de Kv sont affectées par l'action de la lipase [136, 137]. Le traitement de la membrane d'ovocyte avec une lipase différente, la sphingomyélinase C (SmaseC), élimine complètement le groupement phosphate et laisse seulement un céramide. Ceci a pour effet d'immobiliser complètement le VSD dans l'état au repos [137]. Il est alors suggéré que l'absence de phospholipides à proximité du VSD l'empêche d'atteindre un état conformationnel activé. Ceci vient appuyer l'hypothèse émise lors de mesures d'électrophysiologie en bicouche selon laquelle les interactions arginines - phosphates sont nécessaires pour que le canal KvAP atteigne l'état ouvert [138]. Des études d'accessibilité en vésicules sur ce même canal démontrent que l'absence de phospholipides stabilise le VSD dans l'état au repos [140].

Que se passe-t-il lorsque le VSD est majoritairement en présence de non phospholipides? Les interactions entre S4 et les lipides seraient alors dominées par des ponts hydrogène et des interactions hydrophobes, et les VSD resteraient dans l'état au repos, où les arginines sont moins exposées aux lipides dans cette conformation [41, 94, 139] (voir figure 1.7).

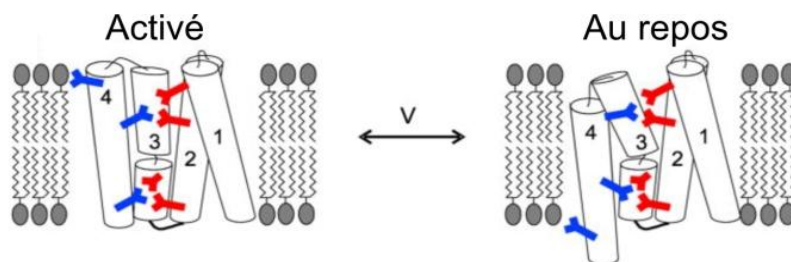


Figure 1.7. Représentation schématique des interactions stabilisantes entre les têtes phosphatées des lipides de la membrane et des arginines de S4. À gauche, le VSD est dans l'état activé et à droite, dans l'état au repos. Les résidus arginines sont en bleu et les résidus acides (glutamates et aspartates) sont en rouge. Figure adaptée de Swartz *et al.*, *JMB*, 2012 ([152]).

Cette explication est cependant trop simpliste, car les résidus hydrophobes du VSD, surtout ceux situés entre les arginines, contribuent déjà à la stabilité de cet état [140, 156]. De plus, la mutation des arginines R1 et R2 en résidus neutres ou négativement chargés n'empêche pas la transition vers l'état activé pour les canaux Shaker et KvAP [37, 52, 94, 120, 140, 156]. Les groupements phosphodiester serviraient donc plutôt à faciliter la transition du VSD en entier plutôt qu'à stabiliser les arginines R1 et R2 [140].

Le DOTAP, un non phospholipide cationique, exerce un effet marqué sur KvAP: la courbe conductance-voltage est déplacée vers des potentiels plus dépolarisants. On ne sait pas si cet effet provient de la charge nette positive ou de l'absence du groupement phosphate qui déstabilise la structure du VSD. Des études de résonance magnétique nucléaire (NMR) montrent que la structure secondaire globale du VSD isolé de KvAP demeure semblable, qu'il soit reconstitué dans des phospholipides ou dans le DOTAP. En effet, le DOTAP n'induit aucun déplacement de pics dans le patron obtenu, même dans l'environnement local des arginines de S4 [152, 153]. Le VSD retient son intégrité structurale après reconstitution dans le DOTAP et maintient sa forte hydratation. Une diminution d'environ 20% des interactions avec les groupements fonctionnels des lipides est observée, mais les contacts avec les queues hydrophobes demeurent équivalents. Le DOTAP n'altère donc pas de façon évidente la stabilité structurale des VSD [152].

Un mécanisme de *gating* dépendant des lipides a été démontré, où il est possible de contrôler l'état conformationnel du VSD sans aucun changement dans le voltage transmembranaire, simplement en manipulant la composition lipidique environnante [140, 145, 157]. Ces changements d'état sont couplés au pore, suggérant que les Kv peuvent être entièrement maîtrisés par les lipides. Une récente étude de *EPR* sur le canal KvAP propose qu'un changement d'environnement lipidique (avec et sans groupement phosphate) provoque un changement conformationnel du VSD selon un modèle de *tilt shift* [157]. Ce modèle, où S4 subit une simple inclinaison de 3 Å ainsi qu'une translation verticale de 2 Å, est très semblable à celui du transporteur pour le *gating* voltage-dépendant. Il reste à déterminer si oui ou non, les mécanismes de *gating* induits par les lipides et le voltage sont identiques, et si ce modèle de *tilt shift* est inhérent au canal KvAP.

1.1.5.2 Sites de liaison

La fonction des Kv reposant principalement sur la capacité de charges positives à se déplacer dans un champ électrique membranaire, il n'est pas si surprenant que la modification de la polarité des lipides entraîne des effets sur la réponse des Kv. Un des mécanismes électrostatiques les mieux caractérisés est celui des acides gras polyinsaturés (PUFAs), qui modulent la courbe d'activation voltage-dépendante des canaux Shaker. La direction de l'effet est déterminée par la charge nette de la tête polaire des PUFAs qui sont ajoutés [142, 143]. Un site d'action est déterminé du côté extracellulaire, à proximité de la boucle S3-S4, qui affecterait directement l'arginine R1 et dont la portée n'excède pas 6-10 Å [141]. Ceci signifie-t-il qu'il existe des sites de liaison spécifiques pour les lipides chez les Kv? Alors que des sites de liaison pour certaines toxines ainsi que divers composés pharmacologiques ont déjà été identifiés sur le VSD, aucun n'a été formellement caractérisé pour les lipides. Les données actuelles montrent qu'il n'y a pas de sites de haute affinité ($k_D < 75$ mM) qui dictent les interactions lipides-VSD, mais que les effets sur sa conformation résulteraient plutôt de multiples sites de faible affinité ($k_D \sim 100$ mM) qui interagiraient avec les lipides environnants [140]. Cependant, les canaux affichent des préférences pour certains lipides. L'activité de KcsA est favorisée par des phospholipides anioniques tels que le POPG et semble même avoir un site de liaison, observé dans la structure cristalline [158]. L'activité de trois homologues de Nav bactériens testée dans différents lipides indique des profils différents d'affinité pour chaque canal [159]. L'importance des interactions lipides-protéines est telle que le même canal exprimé dans différents types cellulaires n'aura pas le même comportement électrophysiologique et sera affecté différemment par la modification de lipides *in situ* tel que l'ajout d'une lipase [145].

1.2 Couplage électromécanique

Les réarrangements conformationnels des domaines senseurs de voltage initiés par des changements de potentiel sont propagés au domaine du pore pour finalement ouvrir la porte du chemin de conduction (*gate*). Cette *gate* est formée par le croisement des quatre régions C-terminales de l'hélice S6 (S6C) à l'entrée cytoplasmique, le *bundle crossing* [13, 160-163].

Cette transformation d'énergie électrique en travail mécanique implique des interactions entre les VSD et les hélices formeuses du pore. Pourtant, la surface de contacts entre le VSD et le pore est étonnamment petite compte tenu de l'importance de leur communication [4, 74]. De fait, le domaine S1-S4 peut fonctionner indépendamment et être ajouté à une autre protéine pour la rendre voltage-dépendante [164-166]. Le VSD isolé peut aussi être exprimé, replié correctement et amené à la membrane, renforçant l'idée d'un module indépendant [19, 146]. On retrouve même des senseurs de voltage reliés à des domaines cytoplasmiques, comme dans le cas de certaines phosphatases [167]. Cependant, des études de scan systématique montrent que les résidus difficilement remplaçables de S5 et S6 font face au VSD, et que similairement, ceux de S4 font face au pore [89, 90, 168]. Ainsi, même si le senseur de voltage semble pouvoir opérer comme un module indépendant et ne fait que peu de contacts avec le pore, ces contacts sont importants et spécifiques.

Comment les réarrangements conformationnels du senseur de voltage mènent-ils à l'écartement du *bundle crossing* de S6? À première vue, il pourrait sembler que le VSD "tire" simplement sur la partie intracellulaire de S5 via le seul lien covalent, le linker S4-S5. Cependant, les mouvements de charges majeurs du VSD se font indépendamment de l'ouverture du pore, ce qui va à l'encontre d'un couplage direct de ces deux mouvements [169]. De plus, ce sont les hélices S6 qui longent et obstruent le pore, et non S5 [5, 11]. Quelle(s) partie(s) du canal détermine donc le couplage?

1.2.1 Interactions entre le linker S4-S5 et S6C

1.2.1.1 Résidus impliqués

Le rôle crucial du linker S4-S5, l'unique lien covalent entre le VSD et le pore, a été mis en évidence dans de nombreuses études de mutagenèse pour les canaux Shaker, HCN et hERG

[54, 170-176]. Il y a maintenant 10 ans, grâce à des constructions chimériques où le pore de Shaker est remplacé par celui du canal non voltage-dépendant KcsA, il a été démontré que le linker S4-S5 interagit directement avec la partie C-terminale de S6 (S6C) pour promouvoir son ouverture [164, 165]. Ces constructions répondent de manière voltage-dépendante seulement si le linker S4-S5 et le S6C correspondant sont présents. De grandes portions de chacune des régions doivent être conservées, et de mauvais appariements entre ces segments mènent à la formation de canaux possédant une conductance partielle constitutive [164, 165]. L'implication de ces deux régions est corroborée par plusieurs autres études de mutagenèse dirigée et d'électrophysiologie dans plusieurs familles différentes de Kv [170, 172, 177-187].

La structure de Kv1.2 est déterminante pour la compréhension du couplage électromécanique et des contacts/interactions impliqués [4, 20]. Un des points saillants de cette structure est que le VSD ne fait pas de contacts avec les hélices du pore d'une même sous-unité, mais bien avec celles d'une sous-unité adjacente, tel que prédit par des études antérieures de *cross-linking* et de scan [67, 168, 188]. Le linker S4-S5 connecte le VSD au pore en passant sous le pore de la sous-unité voisine; cette configuration permettant des interactions intra et inter sous-unité entre le VSD et le pore. La région de S6C faisant contact avec le linker S4-S5 se situe juste après la courbure (*kink*), au niveau du motif conservé PVP ou de la glycine servant de point de pivot dans S6 [20, 189]. L'interaction à l'intérieur d'une même sous-unité est créée par les résidus F481, Y483 et F484 de S6C (numérotation Shaker) qui forment une poche hydrophobe dans laquelle les résidus I384 et T388 du linker S4-S5 vont s'insérer [179, 180] (voir Fig. 1.8). L'alignement de la séquence primaire des membres de la famille Kv1 montre que ces motifs sont effectivement très conservés [169]. De plus, une interaction entre deux sous-unités adjacentes a également été récemment identifiée dans le canal Shaker entre les résidus R394, E395 et L399 du linker S4-S5 et le résidu Y485 de S6C [183]. Cette interaction se développe dans l'état ouvert seulement, et affecte la cinétique de désactivation (retour à l'état au repos). Cette interaction est aussi proposée pour le canal NavAb [117] et le canal KCNQ1 [190].

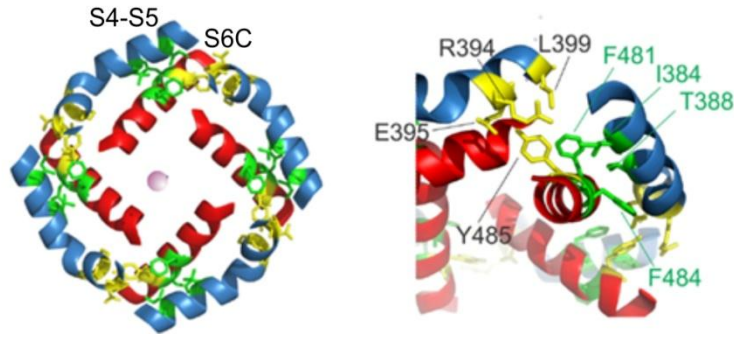


Figure 1.8. Contacts entre le linker S4-S5 et S6C impliqués dans le couplage électromécanique. À gauche, représentation du linker S4-S5 (en bleu) et de S6C (rouge) vue du côté intracellulaire. Les interactions dans une même sous-unité sont coloriées en vert, celle entre sous-unités adjacentes, en jaune. À droite, grossissement des interactions indiquées à gauche. Les chaînes latérales des résidus impliqués sont représentées avec le même code de couleur. Figure adaptée de Blunck *et al.* *FPharm*, 2012 ([169]).

La structure cristalline de Kv1.2 révèle d'autres contacts moins étendus. Du côté extracellulaire, les chaînes latérales de S1 interagissent avec les chaînes latérales de S5 [4, 74, 181] et celles de S6 [181]. Ces interactions, également confirmées par des études de formation de ponts disulfure et scan systématique, serviraient d'ancre au pore pour faciliter le couplage via le linker S4-S5.

1.2.2.2 Découplage

L'efficacité de conversion de l'énergie électrique du VSD au domaine du pore dépend du degré de couplage (ou de "connexion") entre les deux domaines. En temps normal, la stabilisation ou la déstabilisation du VSD dans l'état au repos mène à des effets symétriques sur l'état du pore. Il est cependant possible de découpler complètement les deux domaines avec les mutations I384N, dans le linker S4-S5, et F484G, dans S6C [180]. Le découplage est caractérisé par un déplacement de la courbe charges de *gating* (Q) - voltage (V) à des potentiels moins dépolarisants accompagné d'un déplacement contraire de la courbe conductance (G) -voltage (V) vers des potentiels plus dépolarisants. Un déplacement à gauche de la relation QV signifie que la transition des VSD de l'état au repos à l'état activé nécessite moins d'énergie, alors que le déplacement à droite de la GV signifie que l'ouverture du pore en requiert davantage. Le fait que les canaux demeurent fermés et ce, même à des potentiels

extrêmes de dépolarisation, alors que les VSD peuvent s'activer plus facilement, indique un découplage, ou une perte de connexion entre les deux domaines [90, 178, 180, 191].

Il est alors suggéré que lors d'interactions normales, le pore applique un poids, ou un fardeau mécanique sur les VSD dans l'état au repos [180, 186, 187]. Lors du découplage, ce poids n'est plus présent et les VSD s'activent donc plus facilement, mais par contre perdent leur effet sur la conformation du pore. À l'inverse, une mutation très semblable du même résidu, I384A, renforce le couplage entre les deux domaines, caractérisé par un déplacement à droite de la courbe QV, qui se superpose presque à la courbe GV. Ceci indique un couplage très élevé, où la transition entre les états activé et ouvert se produit instantanément. Une sous-unité ne peut plus entrer dans l'état activé sans obligatoirement entraîner l'ouverture du pore. L'étroit couplage signifie également que plus d'énergie est transférée au pore, permettant à ce dernier de s'ouvrir à des potentiels plus bas [180].

Le renforcement du couplage contraint donc plus le VSD lors de son activation, qui requiert alors plus d'énergie, mais ouvre plus efficacement le pore [180]. Dans le cas d'un couplage renforcé, le pore s'ouvre sous le contrôle étroit des VSD, alors que dans le cas d'un couplage faible ou déficient, les changements dans les VSD n'affectent plus la fermeture ou l'ouverture du canal. Le linker S4-S5 et la région S6C sont donc cruciaux pour le couplage électromécanique.

1.2.1.3 Mode d'action

L'ouverture du pore se ferait en deux étapes séquentielles [192] et se traduit par un élargissement au niveau du motif PVP, permettant l'entrée des ions dans la cavité centrale aqueuse. Pour se fermer, le pore se contracte et forme un bouchon hydrophobe avec les chaînes latérales convergentes de S6 qui longent le pore [5, 13, 160, 193]. Comment le linker S4-S5 agit-il sur la *gate* d'activation pour en dicter l'ouverture ou la fermeture? Deux scénarios sont envisagés: S4 et/ou S4-S5 se comportent comme un ressort qui s'étire ou se comprime lors de l'activation du VSD. Lorsque suffisamment d'énergie est emmagasinée, ils agissent soit en tirant ou en poussant la région S6C en position ouverte. Dans le deuxième cas, le linker S4-S5 agirait plutôt comme un boulon, qui empêche le pore de s'ouvrir. Lorsqu'il se déplacerait durant l'activation, le pore suivrait passivement cette ouverture. Dans ce cas cependant,

l'énergie d'ouverture ne serait pas fournie par le VSD. De plus, seule la QV et non la GV serait affectée par les mutations de découplage, ce qui ne correspond pas aux données expérimentales obtenues [169]. Dans les deux cas, le linker S4-S5 et S6C doivent être en contact étroit dans l'état fermé du pore, car une interaction qui se produirait dans l'état ouvert signifierait une augmentation d'énergie de l'état activé et déplacerait la QV vers la droite en situation de découplage, ce qui n'est pas observé [194].

1.2.1.4 Closed-state inactivation

Les canaux Kv possèdent un mécanisme d'autorégulation lors d'une dépolarisation prolongée, l'inactivation. Celle-ci se produit habituellement *après* l'ouverture du pore: alors que les VSD ne sont pas encore retournés dans l'état au repos, la conduction ionique du pore est diminuée ou abolie complètement. L'inactivation rapide (en terme de millisecondes) de type N est basée sur un mécanisme dit de *ball and chain* qui obstrue le pore à son extrémité cytoplasmique: la partie intracellulaire N-terminale de n'importe laquelle des quatre sous-unités se glisse à travers la *gate* d'activation jusqu'au vestibule et bloque l'accès aux ions [195-198]. L'inactivation lente de type C a des implications structurales différentes, car c'est le filtre de sélectivité qui agit comme une seconde *gate* en altérant sa conformation [199-203]. Ce type d'inactivation est très sensible à la concentration des ions perméants et aux bloqueurs [204-206].

Un autre type d'inactivation est observé, qui survient *avant* l'ouverture du pore (*closed-state inactivation*, CSI), alors que les VSD sont dans l'état activé "pré-ouvert". Observé chez les Nav [207], Kv3.1 [208] et Kv2.1 (delayed rectifier) [209], la famille Kv4 montre la plus forte préférence pour ce type d'inactivation [210, 211]. Le CSI a été décrit très tôt de façon quantitative et qualitative chez les canaux Nav, en raison de la divergence existant entre la probabilité d'ouverture et la probabilité d'inactivation [212-216]: dans un protocole de pré-pulses à de faibles voltages dépolarisants, le pic de courant maximal du second pulse nécessite plus de temps pour se développer qu'il n'en faut à l'inactivation pour apparaître durant le pré-pulse. Plus récemment, le CSI a également été observé chez le canal KvAP [217]. Le CSI se traduit électriquement entre autre lorsque durant une paire de pulses de dépolarisation, l'amplitude maximale du courant du second pulse est inférieure à l'amplitude de la fin du premier pulse [217, 218]. Ceci signifie que durant l'intervalle entre les deux pulses, alors que

les canaux sont maintenus fermés, certains s'inactivent directement et ne s'ouvrent pas lors du second pulse.

Plusieurs modèles de gating ont été proposés, où l'inactivation est directement accessible à partir de l'état fermé activé [217-219]. Ce type d'inactivation aurait un mécanisme distinct du l'inactivation de type C observé dans Shaker [220]. Cependant, les bases moléculaires qui sous-tendent le CSI sont méconnues.

Il est suggéré que S4, le linker S4-S5 et S6C soient les acteurs principaux de sa mise en place. Le VSD pourrait même adopter un état conformationnel distinct pour entraîner le CSI. Un couplage électromécanique déficient, probablement entre le linker S4-S5 et la partie C-terminale de S6, résulterait en l'incapacité d'ouvrir la *gate* d'activation lors de l'activation du VSD [185, 210, 221, 222]. Une séparation temporaire du VSD et du pore, décrite comme un couplage "dynamique" entre les régions S4-S5 et S6C, c'est-à-dire dont la force peut varier, est également suggérée [223]. Les résidus impliqués interagiraient non seulement pour ouvrir la *gate* d'activation, mais seraient aussi des partenaires dynamiques dans le CSI, où les résidus du linker S4-S5 échoueraient à engager ceux de S6C [185]. C'est également la vision proposée pour KvAP, où un mécanisme de glissement (*slippage*) existerait entre les linkers S4-S5 et S6 au moment de l'ouverture du pore, et qui serait proportionnel à la fraction inactivée [217]. Chez les Kv, le scénario de couplage temporairement défectueux serait l'équivalent de celui proposé pour les récepteurs au glutamate comme mécanisme de désensibilisation, lorsque les domaines de liaison du ligand se désengagent alors que le ligand est toujours présent [224]. La résolution récente de la structure cristalline d'un canal Nav bactérien, NavRh, serait dans l'état pré-ouvert inactivé typique au CSI [77]. Les VSD sont activés et le pore fermé, et peu de contacts sont observés entre le linker S4-S5 et S6C dans cette structure, suggérant une forme de découplage.

1.2.2 Interactions entre les hélices S4 et S5

L'ouverture du pore demeurant voltage-dépendante même en présence de mutations découplantes [180], d'autres interactions entre le VSD et le pore doivent exister. L'arrangement particulier où un VSD est positionné à proximité d'un pore d'une sous-unité voisine offre une explication à la coopérativité observée lors de la dernière étape du

mouvement des VSD avant l'ouverture du pore [89]. Les régions extracellulaires de S4 et S5 de sous-unités adjacentes sont ainsi en contact étroit [67, 178, 188, 225, 226] et des mutations longeant la surface de S4 faisant face à S5 ont un impact significatif sur la dernière étape de détection du voltage et d'ouverture du pore [89, 90].

Trois substitutions sur des résidus non chargés de S4 (V369I, I372L et S376T, mutations ILT) isolent la dernière étape d'ouverture du pore sans modifier les mécanismes d'activation du VSD [89, 90, 162, 227]. L'entrée dans l'état au repos requiert des potentiels plus négatifs, et le mouvement coopératif de S4 nécessite une dépolarisation plus forte. Les mutations ILT modifient les interactions entre la face hydrophobe de S4 et de S5 voisine, mais ont surtout un effet sur les cinétiques de *gating*. Par contre, des mutations sur la partie N-terminale de S5 faisant face à cette région de S4 perturbent significativement le couplage [178, 228], suggérant un deuxième contact direct entre le VSD et le pore en plus de celui formé par le linker S4-S5 et S6C.

1.2.3 Modèles énergétiques du couplage électromécanique

Les quatre VSD bougent et s'activent de façon indépendante avant l'ouverture concertée du pore [85], le système doit donc posséder une certaine élasticité pour pouvoir emmagasiner l'énergie fournie par l'activation des VSD jusqu'à ce que les quatre senseurs soient "prêts". Les bases structurales de cette élasticité ne sont pas connues. Par contre, elle transparaît dans les profils énergétiques du couplage électromécanique, et deux modèles d'interactions entre le VSD et le pore sont proposés.

Le modèle allostérique, ou coopératif, considère le VSD et le pore comme deux entités, pouvant chacune transiter de l'état au repos - activé, et fermé - ouvert, respectivement. Il y aurait échange d'énergie entre les deux modules et la conformation activée des VSD stabiliserait l'état ouvert du pore [229]. Ce modèle implique que le pore aurait une probabilité de s'ouvrir aux mêmes potentiels que les VSD pour s'activer, et que le canal aurait également la possibilité de s'ouvrir spontanément même à des potentiels très négatifs. Cependant, il est démontré que les mutants découplés ont une probabilité très basse d'ouverture dans cette fourchette de potentiels [90, 178, 180, 229].

Dans le modèle obligatoire, ou séquentiel, le pore ne peut pas s'ouvrir si les VSD ne sont pas d'abord tous activés. Un modèle séquentiel décrit les états énergétiques du système en entier comme suit: repos-activé-ouvert [180]. Contrairement au modèle coopératif, ici le pore n'a pas la possibilité de s'ouvrir à des potentiels négatifs. La probabilité d'ouverture non voltage-dépendante du pore a été estimée plus petite que 10^{-9} [230], ce qui est négligeable et indique que l'ouverture de la *gate* est bien liée (couplée) au mouvement de charges du VSD, supportant un modèle obligatoire. Considérant l'étroite communication entre le VSD et le pore, il est probable que leurs énergies libres respectives soient très dépendantes de la présence de l'autre module. De fait, dans ce modèle, le degré de couplage entre le VSD et le pore influence le niveau d'énergie de l'état intermédiaire activé, satisfaisant aux observations expérimentales du déplacement de la courbe QV en fonction de la force du couplage.

1.2.4 Modèles structuraux et prédictions

À l'inverse des différents modèles suggérés pour le mouvement de S4, les modèles de couplage électromécanique présentés ne sont pas diamétralement opposés; ils ne s'excluent pas totalement l'un l'autre, et plusieurs éléments se recoupent. Une abondance de données électrophysiologiques, informatiques et même structurales le permettent.

Un premier modèle intuitif, basé sur l'interaction entre le linker S4-S5 et S6C observée dans la structure cristalline de Kv1.2, suggère que le mouvement de glissement de S4 pousse le linker S4-S5, et indirectement, la région intracellulaire de S6 aussi, menant à la fermeture du pore au niveau du motif PVP [74].

Plusieurs modèles computationnels ont été proposés pour l'état fermé (section 1.1.4), et les mouvements intracellulaires de S4 et S4-S5 sont extrapolés en MDS afin de prédire le mouvement du linker S4-S5 et l'évolution de son interaction avec la région S6C durant le processus de *gating*. Il est suggéré que le mouvement du VSD mène à une rotation latérale du linker S4-S5, qui à son tour exercerait un torque sur S5 et S6 pour ouvrir le pore, avec seulement un mouvement vertical limité de S4 [51, 118, 119, 121, 127]. Les changements conformationnels de la moitié intracellulaire de S4 durant l'activation seraient couplés de façon rigide au linker S4-S5, qui subirait ainsi un mouvement latéral menant à l'ouverture du pore [51]. Chez l'enzyme Ci-VSD, les grandes variations d'accessibilité observées en spectroscopie

EPR au niveau de S4 se propagent clairement au domaine du linker qui connecte le VSD à la phosphatase [83].

Basé sur de nombreuses données d'électrophysiologie, un modèle détaillé émerge. L'hélice S4 effectue une translation verticale combinée à un *tilt* et à une rotation qui entraîne le linker S4-S5 avec elle. Même si le couplage entre le linker S4-S5 et S6C existe dans l'état ouvert et fermé, sa nature élastique permet un glissement relatif ou une séparation temporaire des deux hélices. Le canal entre dans l'état activé ouvert sans être immédiatement dans sa coordination optimale. Les chaînes latérales doivent se réorienter et s'adapter à leur nouvel environnement et durant cet ajustement, de nouveaux liens se forment pour stabiliser l'état ouvert du pore et du VSD [169]. Durant la fermeture, S6 se redresse et le linker S4-S5 pousse S6C vers l'intérieur [51]. Ce mouvement incline la région N-terminale du linker S4-S5 vers l'intérieur, le rapprochant de S5. Afin de conserver l'interaction S4-S5 intacte dans l'état fermé malgré cette inclinaison horizontale, les hélices S4 et S5 doivent effectuer une rotation durant la fermeture.

Un autre scénario de couplage est basé sur la comparaison des structures entre la chimère Kv1.2/2.1 et le canal NavAb, pour lesquels le pore est dans l'état ouvert et fermé, respectivement. Une dilatation subtile en iris pourrait être suffisante pour ouvrir la *gate* d'activation du pore, et les linkers S4-S5 environnant empêcheraient un mouvement plus large [75]. Le modèle propose que le VSD et le linker S4-S5 bougent d'abord comme un seul module durant l'activation, et qu'ensuite la transition fermé-ouvert du pore soit médiée par un point pivot moléculaire unique à la base de S5. Ce modèle suggère que les VSD effectuent une rotation sur eux-mêmes autour du pore, entraînant le déplacement vers l'extérieur des hélices S5 et S6, et pivotant le linker S4-S5 dans le plan de la membrane (voir Fig. 1.9) [75]. Une simulation tout atomes avait antérieurement suggéré aussi un tel mouvement de roulement des VSD autour du pore [127], et la structure cristalline d'un autre Nav suggère même une rotation antihoraire de 30° autour du pore [77].

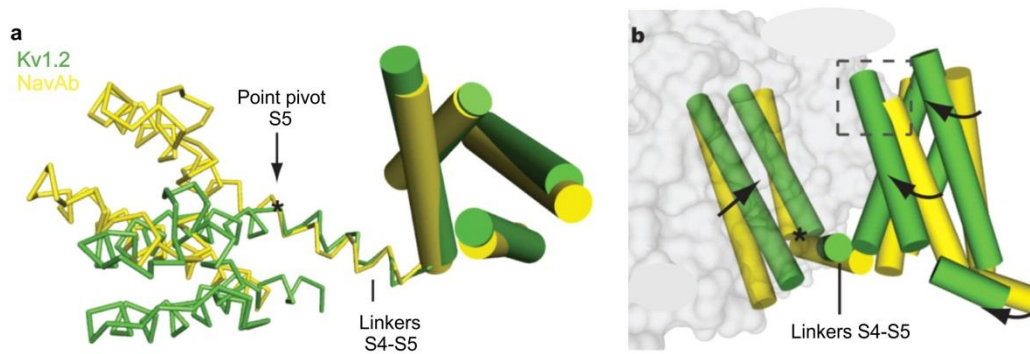


Figure 1.9. Superposition des structure de NavAb et Kv1.2 à partir de leur VSD.
 (a) Les domaines du pore divergent à partir du point pivot à la base de S5. En vert, Kv1.2 en conformation ouverte, et jaune, NavAb en conformation fermée. (b) Représentation en cylindres du déplacement des hélices. Les linkers S4-S5 pivotent par rapport au plan de la membrane. Figure adaptée de Payandeh *et al.* *Nature*, 2011 ([75]), avec la permission de NPG.

L'augmentation du nombre de structures cristallines dans différents états conformationnels du VSD et du pore permettent de plus en plus d'extrapoler les mouvements et l'évolution des interactions importantes entre le VSD et le pore. Cependant, l'arrivée de nouvelles données structurales *dynamiques* du côté intracellulaire en temps réel permettra de mieux comprendre les mécanismes du couplage électromécanique.

MÉTHODOLOGIE

2.1 Obtention de lipoprotéosomes à partir du canal KvAP purifié

Le protocole décrit ici est basé sur celui de Ruta *et al.* lors de la première caractérisation fonctionnelle du canal KvAP. Provenant à l'origine d'une archaebactérie hyperthermophile (*Aeropyrum pernix*) extraite d'une fosse océanique au Japon, la séquence codante a pu être sous-clonée pour un usage plus courant [231].

2.1.1 Purification de KvAP

2.1.1.1 Expression hétérologue dans *E. coli*

La séquence codante de KvAP est insérée dans le vecteur pQE70 (*Quiagen*) entre les sites de restriction *SphI* et *BglII*. Un site de clivage pour la thrombine est inséré en C-terminal juste devant une étiquette hexa-histidine. Pour toutes manipulations impliquant l'amplification de l'ADN, le vecteur est transformé dans des cellules compétentes de souche *E. coli* XL1-Blue (*Agilent*). Pour l'expression protéique, les cellules compétentes *E. coli* M15 sont utilisées (*Quiagen*). Une pré-culture de 100 mL de milieu LB auquel est ajouté 100 µg/mL d'ampicilline et 25 µg/mL de kanamycine est inoculée avec une colonie et incubée jusqu'au lendemain à 37°C à une agitation de 240 RPM. 10 mL de cette pré-culture sont utilisés pour inoculer ensuite 1L de milieu LB contenant les mêmes concentrations d'antibiotiques. La culture est incubée dans les mêmes conditions durant environ 2h30, soit jusqu'à ce que la densité optique à 600 nm atteigne 0.6. Dépendamment de l'usage et des mutants utilisés, de 1 à 4 L de culture sont nécessaires. L'induction est alors initiée en ajoutant 0.5 mM d'IPTG (isopropyl-thiogalactosidose, *Biolynx*). Du glycérol est également ajouté à une concentration de 5% ainsi que 10 mM de BaCl₂ afin de bloquer les canaux et réduire la toxicité cellulaire. La température est baissée à 30°C pour 4 heures ou toute la nuit, selon les mutants. Ensuite, les culots bactériens sont récoltés par centrifugation à 10 000 g (8 000 RPM, rotor JA-14, *Beckman*) durant 15 minutes.

2.1.1.2 Solubilisation des membranes

Les culots ainsi obtenus peuvent être soit congelés à -80°C pour une période indéfinie, soit être directement resuspendus à une densité de 7.5 mL/g dans un tampon salin contenant 200 mM NaCl, 50 mM KCl, 50 mM Hepes et dont le pH est ajusté à 7.4 avec du NaOH (tampon Co-resin pour la suite). Des inhibiteurs de protéases sont également ajoutés: 1mM PMSF (phénylméthylsulfonyl fluoride) et 2 μM Bestatin. Les bactéries sont lysées par pression à 14 000 p.s.i. avec un EmulsiFlex-C5 (*Avestin*). L'échantillon obtenu est d'abord centrifugé à basse vitesse (10 000 g) pour le débarrasser des plus gros débris. Le surnageant est ultracentrifugé à 200 000 g (45 000 RPM, rotor 70Ti *Beckman*) afin d'obtenir un culot de membranes. Les membranes correspondant à 1 ou 2L de culture sont déposées dans 5 mL de tampon Co-resin. À ce stade, elles peuvent être congelées à -80°C pour une durée indéterminée. Sinon, les membranes sont immédiatement homogénéisées en présence de 1% de glycérol. 2% de détergent DM (décylmaltoside, *Anatrace*) est ensuite ajouté et l'échantillon est incubé 1 heure à 4°C .

2.1.1.3 Chromatographie d'affinité pour ions métalliques immobilisés (IMAC)

Les débris non solubilisés sont retirés par ultracentrifugation à 100 000 g (27 000 RPM, rotor SW60 *Beckman*). Le surnageant est ensuite incubé durant 1 à 2 heures à 4°C sur une plaque agitatrice avec la résine de cobalt (Talon Superflow, *Clontech*) préalablement équilibrée dans le tampon et contenant en plus 15 mM d'imidazole et 0.25% de DM. Le mélange résine – échantillon est chargé dans une colonne d'une capacité de 10 mL (*GE Healthcare*) branchée sur un système FPLC (*AKTA*). Le lavage de l'échantillon s'effectue avec 15 mM d'imidazole. L'évolution de la purification est monitorée par détection dans l'UV à 280 nm. Lorsque le signal retourne à la ligne de base, KvAP est détaché de la colonne en augmentant la concentration d'imidazole à 400 mM. La fraction collectée est concentrée à 10-15 mg/mL (*Amicon 50K, Millipore*). La présence et la pureté de KvAP sont vérifiées par immunobuvardage (anticorps anti-His conjugué HRP, *Biolynx*) et coloration au bleu de Coomassie, respectivement. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE, 12% de bis-acrylamide) est utilisée pour la détection.

Des passages sur colonne de *size exclusion chromatography* (SEC) ont également été effectués avec différents détergent: 0.025% DM, 0.025% DM-NG (décylmaltoside-néopentylglycol, *Anatrace*) et avec 0.01% d'amphipols (A8-35, *Anatrace*). Les trois types de détergent ont mené au même profil de rétention, et la stabilité de la protéine dans le détergent après purification était très grande.

2.1.2 Reconstitution de KvAP en vésicules

Les lipides tels que DPhPC, DOTAP, POPE, POPG (*Avanti Polar Lipids*), conservés dans le chloroforme, sont d'abord séchés sous un jet d'azote durant au moins 10 minutes et réhydratés dans le tampon de dialyse (450 mM KCl, 10 mM Hepes, pH7.4) à une concentration de 10 mg/mL. Les vésicules unilamellaires de petite taille (SUVs, 15 à 50 nm) sont produites par sonication vigoureuse dans un bain à une fréquence de 80 kHz à puissance maximale (*Fisherbrand*). Les SUVs et KvAP sont mélangés par vortex dans un ratio protéines:lipides variant de 1:1 à 1:10 et placés sur une plaque agitatrice pour une heure. Le détergent est lentement retiré par dialyse à 4°C (Slide-A-Lyzer MINI 20K MWCO, *Pierce*). Le tampon de dialyse est changé au moins toutes les douze heures pendant au moins 3 jours. L'échantillon est ensuite conservé à -80°C en aliquots de 10 µL.

2.2 Mesures d'électrophysiologie

2.2.1 Bicouche plane (*Black lipid membrane*)

Le protocole d'électrophysiologie décrit ici est basé sur des protocoles antérieurs utilisés pour KvAP par le groupe de R. MacKinnon [138, 231]. Au lieu d'un montage traditionnel où la bicouche est verticale par rapport au plan de la table de travail, celle-ci est peinte sur une chambre déposée au-dessus d'un objectif de microscope inversé, permettant sa visualisation lors de la prise de mesures et le cas échéant, des mesures simultanées de spectroscopie.

2.2.1.1 Lipides utilisés pour la formation de bicouches

Les bicouches sont formées en peignant des lipides dissous dans le décane à une concentration de 25 mg/mL sur une ouverture de 250 μm de diamètre percée dans une feuille mince de polymère (acétal-copolymère, téflon ou HDPE - *high density polyethylene*). Les lipides le plus couramment utilisés pour travailler en bicouche avec KvAP sont généralement un mélange de glycérophospholipides comportant des chaînes acyles mixtes de 16 et 18 carbones avec un seul degré d'insaturation (voir Fig. 2.1). Le palmitoyl-oleoyl-glycérophosphoéthanolamine (POPE) et le palmitoyl-oleoyl-glycérophosphoglycérol (POPG) sont utilisés dans un ratio 3:1 respectivement. Le premier ne comporte pas de charge nette alors que le POPG est anionique. Le diphytanoyl-glycérophosphocholine (DPhPC, fig. 1.2) est également souvent utilisé et confère une grande stabilité aux bicouches. Ses chaînes acyles sont méthylées et comptent 16 carbones. Un autre lipide moins usuel est utilisé, le dioleoyl-triméthyl-ammonium (DOTAP, fig. 1.2). Celui-ci a la particularité de ne pas avoir de groupement phosphate et de porter une charge positive nette. Il peut être utilisé seul, mais une plus grande stabilité est obtenue avec un mélange DOTAP:DPhPC 2:1.

2.2.1.2 Fusion des vésicules et mesures en voltage imposé

Avant d'être ajoutées à la bicouche, les vésicules sont mélangées vigoureusement et brièvement soniquées. En condition symétrique, les solutions internes et externes (*cis* et *trans*) contiennent 150 mM KCl, 10 mM Hepes, pH 7.4. Les SUVs contenant KvAP sont formées dans 450 mM KCl et le gradient ionique ainsi créé contribue à faciliter leur fusion sur la bicouche. En condition asymétrique, la chambre externe (*trans*) contient seulement 15 mM

KCl au lieu de 150 mM, et 135 mM NaCl sont ajoutés pour garder la même force ionique. La fusion des vésicules peut être aidée par l'ajout de 2 μM de sorbitol dans l'échantillon, ce qui "alourdit" les SUVs. L'ajout de calcium n'a pas fait de différence dans un sens ou dans l'autre ici.

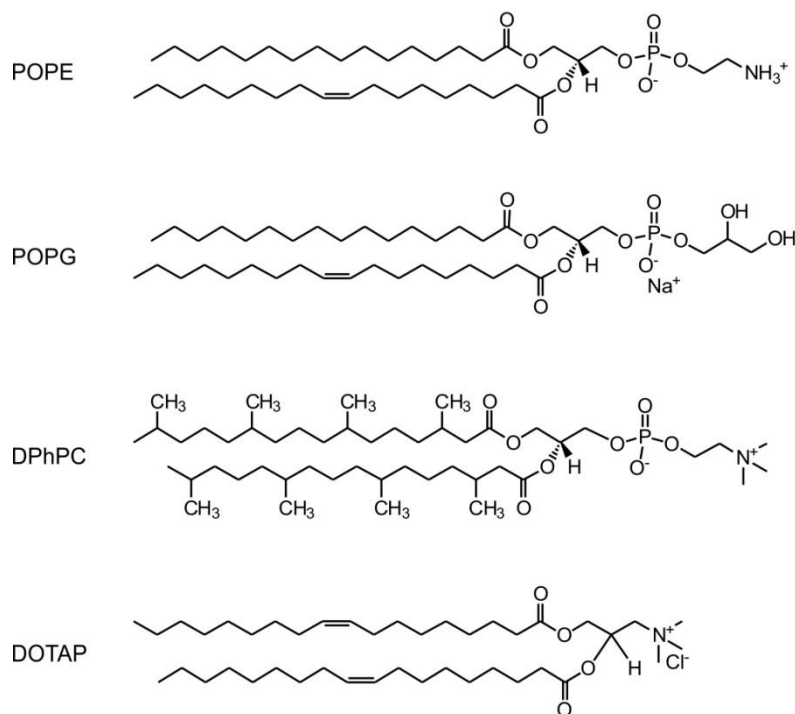


Figure 2.1. Structure des divers lipides utilisés pour la formation de bicouches planaires. Le POPE et le POPG se différencient uniquement par leur tête polaire. Le DPhPC se distingue par une chaîne acyle méthylée et le DOTAP par son absence de groupement phosphate.

Lorsque les courants désirés sont observés, la solution interne est échangée afin d'éviter tout événement de fusion supplémentaire durant la prise de mesures. Des courants d'ordre macroscopique sont généralement souhaités, idéalement environ 1 nA de courant à +100 mV, correspondant à presque une centaine de canaux (conductance unitaire de 10-12 pS à ce potentiel). Les relations courant-voltage de KvAP sont obtenues en imposant des pulses d'une durée de 500 ms allant de -100 mV à +100 mV en incréments de 10 mV. Un intervalle d'attente de 100 secondes entre chaque pulse à -100 mV permet aux canaux de récupérer pleinement de leur inactivation. Les courants sont détectés via un amplificateur Axiovert 1D (*Axon Instruments*) et enregistrés avec le programme GPatch (*UCLA, Department of*

Anesthesiology). Les relations courant-voltage sont analysées grâce au programme *Analysis* (*UCLA*) et une courbe de la conductance ionique en fonction du voltage est obtenue avec la relation suivante:

$$G = \frac{I}{V - V_{eq}}$$

où G est la conductance ionique; I est le courant; V est le voltage imposé; V_{eq} le voltage où le potentiel électrochimique de l'ion potassium est à l'équilibre de part et d'autre de la bicouche.

Les valeurs d'activation à mi-parcours ($V_{1/2}$) et du degré de la pente (V_s) sont retirées à partir d'une distribution de Boltzmann simple appliquée à la relation conductance-voltage:

$$\frac{G}{G_{max}} = \frac{1}{1 + \exp \left(\frac{x - V_{1/2}}{V_s} \right)}$$

2.3 Mesures de LRET en vésicules

2.3.1 Lanthanide-based Resonance Energy Transfer (LRET)

L'excitation d'une molécule à des niveaux électroniques supérieurs peut entraîner l'émission d'un photon lors du retour à l'état fondamental, un phénomène à la base de la fluorescence. La relaxation de l'électron excité à un état vibrationnel de base fait en sorte que l'émission est moins énergétique que l'excitation, d'où la séparation des pics d'absorption et d'émission des fluorophores en fonction de la longueur d'ondes (déplacement de Stokes). Les fluorophores habituels tel que le tétraméthylrhodamine (TMR) et la fluorescéine demeurent généralement de 1 à 10 ns dans l'état excité. Les lanthanides, tels que le terbium et l'euporium, se distinguent par un temps de vie plus long dans l'état excité, de l'ordre de la milliseconde, dû à des transitions électroniques dites "interdites". Cette particularité est exploitée pour la détermination précise de distances intra- ou intermoléculaires. Le lanthanide utilisé ici est le terbium, complexé avec un chélate. Ce complexe autour de l'ion terbium comprend: une antenne, car l'absorption molaire des lanthanides est très faible et l'excitation directe peu efficace, une cage protectrice pour éviter l'extinction de la luminescence (*quenching*), notamment par des molécules d'eau, et enfin un groupement maléimide (voir Fig.2.2)

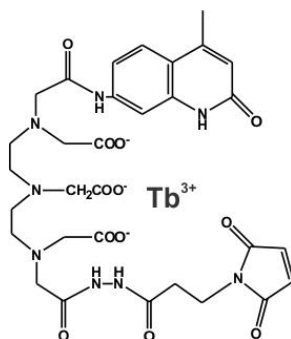


Figure 2.2. Structure du chélate de terbium. L'antenne est formée du chromophore carbostyryl (les 2 cycles aromatiques) et la cage protectrice d'une molécule de diéthylène triamine penta acétique dianhydride (DTPA). Un lien maléimide est également présent (cycle pyrrole).

L'énergie de résonance du dipôle d'une molécule excitée peut être transférée au dipôle d'une molécule voisine et l'exciter à son tour: le transfert d'énergie de résonance (RET). L'utilisation du RET permet de mesurer des distances entre un donneur et un accepteur séparés de 30 à

100 Å. L'efficacité du transfert d'énergie (E) entre un donneur et un accepteur dépend de la distance qui les sépare élevée à la sixième puissance inversée:

$$E = \frac{1}{1 + (r/R_0)^6}$$

où E est l'efficacité du transfert d'énergie, r est la distance entre le donneur et l'accepteur et R_0 la distance à laquelle 50% de l'énergie est transférée du donneur à l'accepteur, pour des sondes données.

La détermination de la valeur R_0 , en plus d'être basée sur le recouvrement spectral de l'émission du donneur et de l'absorption de l'accepteur (Fig. 2.3), dépend également de l'orientation des dipôles du donneur et de l'accepteur l'un par rapport à l'autre (le facteur kappa, κ). Cette valeur oscille entre 0 et 1, correspondant à un angle de 90° et 180° respectivement. En FRET, les valeurs absolues des distances peuvent parfois manquer de précision à cause de l'incertitude liée à cette valeur, mais comme le terbium émet de façon isotropique, la précision en est accrue.

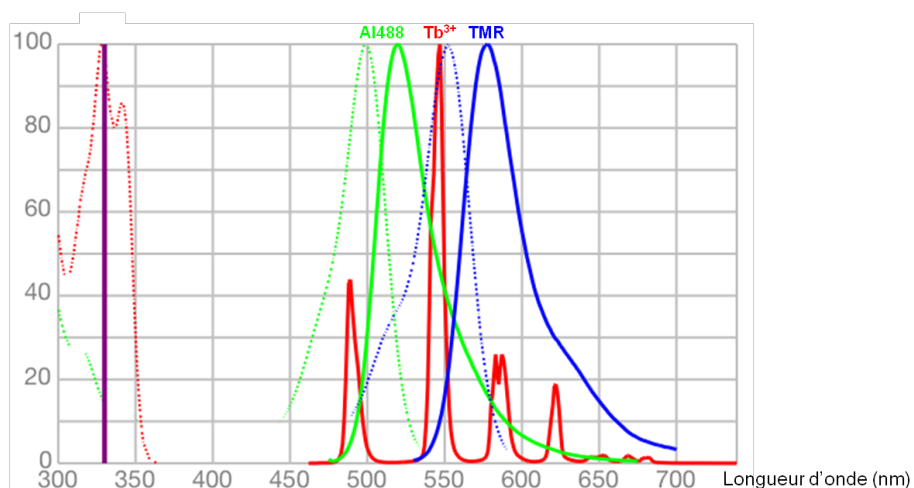


Figure 2.3 Recouvrement spectral de sondes utilisées pour les mesures de LRET. Les spectres d'absorption sont tracés en ligne pointillées et ceux d'émission, en lignes pleines. L'émission du chélate de terbium consiste en 4 pics bien définis (rouge). Les spectres de deux accepteurs utilisés sont présentés. Alexa 488 (en vert) fournit un R_0 de 43.4 Å et celui du TMRM (tétraméthylrhodamine maléimide, en bleu) est de 51.6 Å. (R_0 déterminés expérimentalement)

La valeur E se détermine expérimentalement, en utilisant soit les variations d'intensités de fluorescence pour le FRET, ou la décroissance de l'état excité en LRET. La durée du temps de vie dans l'état excité du donneur est influencée par la présence d'une molécule accepteur à proximité, en fonction de la distance à laquelle elle se trouve. Cette manière de détection comporte plusieurs avantages au niveau de l'acquisition du signal. Le bruit de fond provenant de l'excitation directe de l'accepteur est éliminé de manière temporelle (90 μ s versus 1 ms) ainsi que la dépendance à la concentration de l'échantillon liée aux mesures d'intensités. La mesure de l'émission sensibilisée de l'accepteur (*sensitized emission*, SE) permet également de discriminer le signal de LRET de celui de l'émission du donneur seul. En effet, après transfert d'énergie, le temps de vie dans l'état excité de l'accepteur devient le même que celui du donneur en présence d'accepteur. Ainsi, même en présence majoritaire de donneurs, en réglant le filtre d'émission sur celle de l'accepteur, l'émission découlant de l'excitation de donneurs seuls est éliminée.

2.3.2 Marquage spécifique

La liaison spécifique d'une molécule fluorescente à un site d'intérêt s'effectue via un groupement maléimide qui réagit spécifiquement avec un groupement thiol réduit, porté par un résidu cystéine dans la protéine. Le seul résidu cystéine endogène de KvAP en C-terminal est remplacé par une sérine et une série de mutants cystéine le long du linker S4-S5 est produite par mutagénèse dirigée (Quikchange, *Qiagen*). La réduction des cystéines s'effectue lors de la purification de KvAP avec 10 mM de TCEP (tris-chloroéthyl-phosphate, *Pierce*).

Le donneur est un complexe de chélate de terbium (LanthaScreen, *Invitrogen* ou synthétisé au laboratoire à partir des protocoles de P. Selvin ([232-234])). Les fluorophores sont ajoutés à un mutant cystéine purifié de KvAP avant la reconstitution en lipoprotéosomes. Pour la condition de marquage du donneur seul, le chélate de terbium est ajouté dans un excès de 5 fois (mol : mol). Pour la condition du mélange donneur-accepteur, le chélate de terbium et l'accepteur sont d'abord mélangés dans une proportion qui permet une efficacité de marquage de 1 : 1. Le mélange de fluorophores est ensuite ajouté à KvAP, également dans un excès de 5 fois. L'excès de fluorophores est retiré par centrifugations successives dans un concentrateur (Amicon 50 kDa, *Millipore*).

2.3.3. Stratégie d'optimisation du signal

Afin de simplifier l'analyse du signal de LRET, une construction dimérique de KvAP est produite, où l'extrémité C-terminale d'un monomère est relié par un linker peptidique à l'extrémité N-terminale d'un autre monomère (voir Fig. 2.4). Après de nombreux tests comparatifs d'expression, un linker peptidique de quatre glutamines suivis d'une sérine est retenu. Le dimère est exprimé selon le même protocole décrit en 2.1.1. Cette disposition permet d'insérer seulement deux résidus cystéines par tétramère, sur des linkers S4-S5 situés de part et d'autre du pore. De cette façon, le marquage fluorescent de sous-unités adjacentes est éliminé, et le signal de transfert d'énergie provient d'une seule distance, ce qui en améliore l'analyse. De plus, la distance ainsi retenue est la plus grande, ce qui permet d'observer plus facilement les variations de distances entre l'état ouvert et l'état fermé. L'expression d'un dimère de dimères présente également l'avantage de simplifier les possibilités de marquage; alors que plusieurs ratios différents donneur: accepteur existent dans un tétramère formés de monomères, seule la combinaison donneur-accepteur 1:1 produira un signal de LRET, réduisant le bruit de fond et augmentant ainsi la qualité du signal (voir Fig. 2.4).

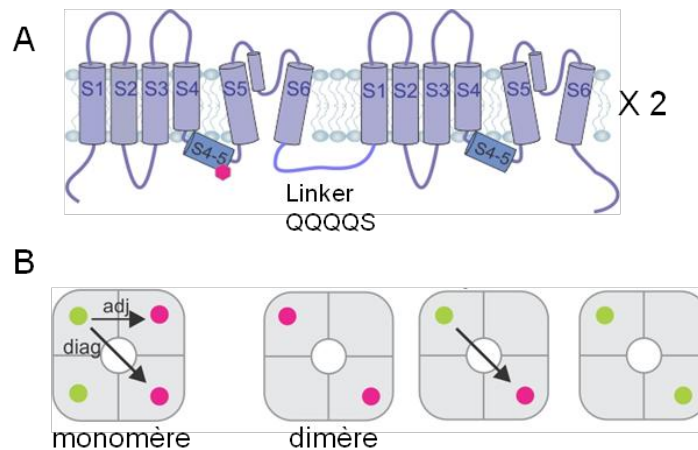


Figure 2.4. Construction d'un dimère de KvAP et optimisation du signal de LRET. (A) Topologie d'un dimère de KvAP. Les extrémités N et C-terminales sont reliées par l'ajout d'un linker peptidique formé de 4 glutamines et de 1 sérine. (B) Possibilités de transfert d'énergie de résonance dans un monomère et dans un dimère.

2.3.4 Acquisition des données

Le trajet optique permettant l'excitation de l'échantillon et la détection du signal de LRET est construit à partir d'un microscope inversé (Axiovert200, Zeiss). La source d'excitation à 337 nm est un laser pulsé de 3 mW (N₂-laser, SpectraPhysics), qui traverse un miroir dichroïque et est dirigée vers l'échantillon. Celui-ci est vortexé, brièvement soniqué et centrifugé, et une goutte de 2 µL est déposée sur une lamelle fine de quartz. Après un pulse du laser, le signal provenant de l'échantillon après excitation est récolté par un objectif en quartz 40X à immersion au glycérol et d'une ouverture numérique de 1.25 (Partec). Une roue avec divers filtres d'émissions permet de filtrer le signal avant qu'il ne soit envoyé sur la surface de la diode de 100 µm d'un compteur de photons (Single Photon Counter[®]^{blue}-Series, Laser components). Le programme GPatch (UCLA) permet de synchroniser le pulse du laser et le détecteur, ainsi que d'enregistrer les comptes de photons détectés après un pulse durant 20 ms.

2.3.5 Détermination des distances entre les linkers S4-S5

Le signal de LRET de chaque mutant KvAP est moyenné sur une centaine de pulses. L'analyse de la décroissance exponentielle de l'état excité (programme maison de *fits* d'exponentielles, MATLAB) permet d'en extraire les constantes de temps de vie et de déterminer la distance qui les sépare avec la relation suivante:

$$E = 1 - (\tau_{SE}/\tau_{DO})$$

où E est le transfert d'énergie entre le donneur et l'accepteur, τ_{SE} est la constante de temps de l'accepteur sensibilisé (*Sensitized Emission*) et τ_{DO} , celle du donneur en absence d'accepteur.

Lorsque l'efficacité du transfert d'énergie est connue, la distance entre les deux sondes se calcule avec la relation suivante:

$$r = ((1 - E)/E)^{1/6} \times R_0$$

où r est la distance qui sépare le donneur de l'accepteur, E est le transfert d'énergie entre les deux et R_0 est la distance à laquelle 50% de l'énergie est transférée du donneur à l'accepteur, pour une paire de sondes donnée.

**A LIMITED 4 Å RADIAL DISPLACEMENT OF THE S4-S5 LINKER IS SUFFICIENT
FOR INTERNAL GATE CLOSING IN KV CHANNELS**

Élise Faure^{†,‡}, Greg Starek^{‡,&}, Hugo McGuire^{†,§}, Simon Bernèche[‡] and Rikard Blunck^{†,§,‡,1}

[†]Groupe d'Étude des Protéines Membranaires (GÉPROM), Departments of [§]Physics and [‡]Physiology, Université de Montréal, Montréal, QC, H3C 3J7 and

[‡]Swiss Institute of Bioinformatics and Biozentrum, University of Basel, Basel, Switzerland

[&]Department of Chemistry, University of California, Irvine, CA

Manuscrit publié:

The Journal of Biological Chemistry, 2012 Nov 16; 287 (47): 40091-8

Contribution des auteurs:

EF: participation au design expérimental, production des échantillons, prise des mesures de LRET, prise des mesures d'électrophysiologie, analyse des données, interprétation des résultats, écriture de l'article

GS: simulations de dynamique moléculaire, production du modèle dans l'état fermé

HM: prise des mesures d'électrophysiologie, analyse des données

SB: discussion, interprétation des résultats, écriture de l'article

RB: design expérimental, interprétation des résultats, écriture de l'article

Résumé

Les canaux ioniques dépendants du voltage sont responsables de la génération de potentiels d'action dans notre système nerveux. Les réarrangements conformationnels du domaine senseur de voltage en réponse aux changements de potentiel membranaire contrôlent l'ouverture du pore et de ce fait, la conduction ionique. Les structures cristallines obtenues dans l'état ouvert combinées à une multitude de données biophysiques et de dynamique moléculaire ont mené à un consensus quant au mouvement du senseur de voltage. Cependant, le couplage entre ce mouvement et l'ouverture du pore, le couplage électromécanique, se produit du côté cytoplasmique et aucune donnée structurale sur ce côté du canal n'est disponible pour l'instant. En particulier, la question du degré de l'amplitude de fermeture que la porte cytosolique du pore doit accomplir pour empêcher la conduction ionique demeure controversée. Dans les cellules, les méthodes spectroscopiques sont limitées car le marquage de sites internes est difficile alors qu'en liposomes ou en solutions de détergent contenant des canaux ioniques purifiés, le voltage n'est pas contrôlé. Ici, afin de contourner ces problèmes, nous avons contrôlé l'état du canal en variant l'environnement lipidique. De cette façon, nous avons mesuré directement la position du linker S4-S5 dans l'état fermé et ouvert du canal Kv procaryote KvAP en milieu lipidique en utilisant le LRET *Lanthanide-based Resonance Energy Transfer*. Nous avons pu reconstruire le mouvement du lien covalent entre le senseur de voltage et le domaine du pore et utiliser ces données comme contraintes dans des simulations de dynamique moléculaire de la structure de l'état fermé. Nous avons trouvé qu'une légère diminution du rayon du pore d'environ 3-4 Å est suffisante pour empêcher la perméation des ions au travers du pore.

Abstract

Voltage-gated ion channels are responsible for the generation of action potentials in our nervous system. Conformational rearrangements in their voltage sensor domains in response to changes of the membrane potential controls pore opening and thus ion conduction. Crystal structures of the open channel in combination with a wealth of biophysical data and molecular dynamics simulations led to a consensus on the voltage sensor movement. However, the coupling between voltage sensor movement and pore opening, the electromechanical coupling, occurs at the cytosolic face of the channel, from where no structural information is available yet. In particular the question how far the cytosolic pore gate has to close to prevent ion conduction remains controversial. In cells, spectroscopic methods are hindered because labeling of internal sites remains difficult, whereas liposomes or detergent solutions containing purified ion channels lack voltage control. To overcome these problems, here, we controlled the state of the channel by varying the lipid environment. This way, we directly measured the position of the S4-S5 linker in both the open and closed state of a prokaryotic Kv channel (KvAP) in a lipid environment using Lanthanide-based resonance energy transfer (LRET). We were able to reconstruct the movement of the covalent link between the voltage sensor and the pore domain and used this information as restraints for molecular dynamics simulations of the closed state structure. We found that a small decrease of the pore radius of about 3-4 Å is sufficient to prevent ion permeation through the pore.

Background: For Kv channels, only a crystal structure for the open state is available.

Results: Using LRET, we determined the movement of the S4-S5 linker during gating in KvAP channels.

Conclusion: A small displacement of the S6 by only 4 Å is sufficient for closing of the Kv channels.

Significance: This is the first Kv channel closed state model based on cytosolic restraints

Keywords : Kv channel, gating, internal gate, lipid regulation, LRET, molecular dynamics simulations

3.1 Introduction

Voltage-gated potassium channels (K_v) play a central role in the physiology of all excitable cells and are particularly involved in the repolarization of action potentials in neuronal and muscle cells (1). Defects in K_v channels may cause severe conditions such as cardiac arrhythmias, epilepsy, muscular ataxia or congenital deafness (2). Function of K_v channels is tightly regulated through communication between its two main components: the voltage sensor domain (VSD) and the pore domain (PD). K_v channels are symmetrical tetramers formed by four – mostly – identical monomers, each consisting of six transmembrane helices (S1-S6). The first four alpha-helices of each monomer (S1-S4) yield to the formation of four peripheral VSDs while the collective assembly of the last helices (S5 and S6) constitutes the central pore. Upon depolarization of the cell membrane, the S4 segments undergo a conformational change driven by the positively charged arginines in the electric field (3-6). This conformational change leads to pore opening in a process called electromechanical coupling.

Electromechanical coupling has been intensively studied in recent years (reviewed in 7). Voltage sensor and pore are covalently linked by the S4-S5 linker. This amphiphatic helix also anneals to the C-terminal end of S6 ($S6_T$) of the same and neighboring subunit (8-14). The link to the $S6_T$ is essential for the voltage sensor-controlled pore opening, where the internal gate formed by the S6 is widened. Despite the considerable effort in recent years to study the electromechanical coupling in K_v channels, no structural information is available on the conformational changes on the cytosolic face of the channels, the site of electromechanical coupling. The existing models built using molecular mechanics techniques rely mainly on the open state crystal structure and experimentally defined restraints on the extracellular accessible part of the channel. The problem in obtaining biophysical information from the cytosolic face of the channel is that labeling methods – typically using thiol-reactive chemistry – are not practical for channels expressed in cells or *Xenopus* oocytes, as too many cysteines are available in the cytosol (15). Spectroscopic methods, on the other hand, were impeded by the inability to control the voltage in solution or in small vesicles. Here, we overcame this problem by controlling the state of the channel by varying the lipid composition. It has been described earlier that the voltage dependence of K_v channel opening shifts with differently

charged headgroups of the surrounding lipid matrix (16-23). We made use of the positively charged lipid DOTAP (1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane) to switch the KvAP channel into its resting-closed position. This allowed us to carry out *Luminescence Resonance Energy Transfer* measurements (24-26) in both open and closed conformation. We determined distances of residues all along the S4-S5 linker of KvAP-dimers reconstituted in lipid vesicles to determine the position of the S4-S5 linker in both conformations and reconstructed the movement of the cytosolic face of the channel in molecular dynamics simulations.

3.2 Experimental procedures

3.2.1 Molecular Biology

KvAP coding sequence starting from Methionine 14 was inserted in the vector pQE70 (*Quiagen*) between restriction sites *SphI* and *BglII*, with a thrombine cleavage site between the C-terminal hexa-histidine tag and the channel. The only endogenous cysteine residue of KvAP was replaced with a serine (C247S) by site-directed mutagenesis (*Stratagene*). Two KvAP inserts (I and II) were linked together by a stretch of 5 amino acids (QQQQS) to form the dimer. Insert I had a cysteine mutation in the S4-S5 linker whereas insert II was C-less. The first 8 residues of insert II were deleted.

3.2.2 Purification of KvAP dimers

KvAP dimers were expressed in *E. coli* M15 strain cell cultures (*Quiagen*) grown in LB medium with 100 µg/mL ampicillin and 25 µg/mL kanamycin. At OD₆₀₀ = 0.6, channel expression was induced with 0.5 mM IPTG. At this time, also 5% glycerol and 10 mM BaCl₂ were added to the medium, and the temperature was lowered to 25°C. After 3 to 5 hours, bacterial cells were harvested and lysed by pressure at 15 000 psi with an EmulsiFlex-C5 (*Avestin*). 1mM PMSF was added to prevent protein cleavage. The membranes were isolated by centrifugation at 200 000 x g and solubilized with 20% decyl-maltoside (DM) (*Anatrace*) for 1h at 4°C. The sample was bound to a metal affinity column (Talon Superflow, *Clontech*) and washed with 10mM imidazole (*Sigma*). Sample was maintained in a 200 mM NaCl, 50 mM KCl, 50 mM Hepes, and 0.25% DM pH 7.4 buffer. The cysteines are reduced with 10 mM tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) (*Pierce*) before elution with 400 mM imidazole. Sample is concentrated (Amicon 30K, *Millipore*) to 2-5 mg/mL and ran on SDS-PAGE to confirm presence of dimer and absence of monomer by Coomassie staining and immunoblotting.

3.2.3 Labeling

For the donor only condition (DO), sample was mixed overnight at 4°C with a 5-fold excess (mol:mol) of a terbium chelate complex (Lanthascreen, *Invitrogen*) or with one synthesized in house, based on previous protocols (27,28). For the donor and acceptor condition (DA), the

terbium chelate complex and an organic fluorophore (AlexaFluor[®] 488 C₅ maleimide, Tetramethylrhodamine-5-maleimide, Fluorescein-5-maleimide, all *Invitrogen*, Atto465M, *ATTO-TEC GmbH*) were mixed with proportions that allowed a final efficacy of labeling of 1:1. Excess of dyes was removed by successive washes and centrifugations in a concentrator with a cutoff weight of 50KDa (*Amicon, Millipore*). Background labeling of KvAP C-less dimer was 10-14 times lower than specific labeling.

3.2.4 Channel reconstitution in lipid vesicles

DPhPC (1,2-diphytanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) or DOTAP (1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane) (*Avanti Polar Lipids*) small unilamellar vesicles were prepared by vigorous sonication. The lipids were mixed with the sample in a ratio of ~1:4 protein:lipid (w:w) at a final lipid concentration of 10 mg/mL, well vortexed (2-5 minutes), shortly sonicated and rocked for 1 hour at room temperature. To remove the detergent, sample was loaded in a dialysis device (Slide-A-Lyzer MINI 20K MWCO, *Pierce*) and kept at 4°C shielded from light. Dialysis buffer (450 mM KCl, 10 mM HEPES at pH 7.4) was exchanged twice a day during at least 5 days.

3.2.5 Electrophysiology recordings

Pure DPhPC, pure DOTAP (*Avanti Polar Lipids*) or a 3:4 DPhPC:DOTAP mixture (w:w) were dissolved in decane at 25 mg/mL to form planar lipid bilayers over a hole (250 µm diameter) in a polymer partition that separated the internal and external solutions (150 mM KCl, 10 mM HEPES, pH7.4). Vesicles containing the labeled channels were shortly sonicated and fused to the voltage-clamped bilayer. The elicited macroscopic currents were recorded using an Axiovert 1D amplifier (*Axon Instruments*) and registered using GPatch (UCLA, Dept. of Anesthesiology). Holding potential was -100 mV and depolarizing pulses ranged from -100 to +100 mV with 10 mV increments, with a waiting time of 90 seconds between each pulse to allow channels to recover from inactivation.

3.2.6 LRET measurements

Setup was based on a Zeiss Axiovert 200 microscope. Light at 337 nm from a pulsed 3 mW N₂-laser (*SpectraPhysics*) was directed in a widefield illumination onto a drop of vesicles

containing the labeled channels on a quartz coverslip. The light from the vesicles was collected using a 1.25 NA 40X glycerol immersion quartz objective (Spartec) and filtered with a bandpass emission filter. Light was detected by a photon counter (*Laser Components*). Before each measurement, the samples were vortexed and centrifuged to ensure measurements were performed on native state channels. Analysis of the lifetime decays was done with an exponential fitting program (*Matlab*). Distances were determined using the following relations:

$$\text{Energy transfer (E)} = 1 - (\tau_{SE}/\tau_{DO}),$$

where τ_{DO} is the time constant of the donor lifetime decay in absence of acceptor (donor only), and τ_{SE} the time constant decay of the sensitized emission of the acceptor.

$$\text{Distance between the donor and the acceptor (r)} = ((1-E)/E)^{1/6} \times R_0,$$

with R_0 the distance at which 50% energy transfer occurs. The R_0 values for the different pairs of fluorophores were calculated from experimentally determined spectra based on the spectral overlap of the donor and the acceptor.

3.2.7 Molecular Dynamics simulations

The Kv1.2/2.1 chimera structure (PDB code 2R9R) was used as a template for model generation. Using the CHARMM27 force field for proteins (29), the initial structure was placed in a Generalized Born (GB) implicit solvent membrane model (30), minimized, and briefly simulated (50 ps) with harmonic restraints placed to mimic experimental results discussed herein. The resulting “closed” structure was then reconstituted into DPPC bilayers using the CHARMM-GUI web service (31) and equilibrated by gradually releasing protein backbone restraints over 450 ps. A potential of -500 mV was applied to the “closed” system with NAMD 2.8 (32) and the CHARMM27 and CHARMM 36 (33) force fields for proteins and lipids, respectively. The system was simulated for 100 ns with harmonic restraints applied to linker atoms throughout. Temperature was held constant at 303.15 K with Langevin dynamics, and pressure was held constant using the Langevin Nosé-Hoover method. Water was represented with the TIP3P water model, and high frequency hydrogen vibrations were constrained with the SHAKE algorithm. Aspartate, glutamate, and arginine residues were

reparameterized to recently published values (34). Additional harmonic restraints between the alpha carbons of I230 and Y267, I230 and R290, and I177 and R290 were added to the closed system in accordance with previously published work (35,36).

One subunit from the closed simulation was used to create a fourfold symmetric model of closed protein. This tetramer was reinserted in a GB implicit membrane and minimized with harmonic restraints on the linker atoms, as well as light harmonic restraints along the linker backbone to promote helicity. The protein was again reconstituted into a DPPC bilayer and solvated with TIP3 water molecules, and re-equilibrated with gentle backbone helical restraints applied to the linker and the bottom of S4, as well as harmonic linker restraints between subunits.

3.3 Results

3.3.1 KvAP dimers can be gated by the lipid environment

Luminescence Resonance Energy Transfer (LRET) is a powerful spectroscopic tool to determine atomic-scale distances within a protein (24-26,37,38). Here, we used LRET to measure the position of the S4-S5 linkers of KvAP in the closed and the open state. To do so, a series of cysteine mutations of several positions along the S4-S5 linker (F137-D146) were expressed and purified, to allow site-directed labeling with fluorophores attached to a maleimide linker (see Experimental Procedures).

In a homotetrameric protein – and hence 4 identical binding sites, – stoichiometric labeling would give us any combination of donor and acceptor pairs and two different distances (adjacent and diagonal), requiring a complex analysis of the signals (Fig. 3.1a and see 25). In order to circumvent these difficulties, we constructed a dimer of dimers, where 2 subunits are linked by their intracellular C- and N-terminal ends (Fig. 3.1b and Experimental Procedures). Dimer formation was confirmed by SDS polyacrylamide-gel electrophoresis and Western blot analysis (Fig. 3.1c). Liu et al. (39) demonstrated that such a construct assembles with identical monomers at diagonal positions. A single cysteine per dimer is then inserted by directed mutagenesis into the S4-S5 linker, allowing the specific binding of only two fluorophores per tetramer at identical positions within two opposite monomers (39). The dimer of dimers labeled with a 1:1 ratio of donor and acceptor will thus contain either two identical labels (only donors or acceptors) or one FRET-pair (each one donor and one acceptor). Only those proteins that are labeled with a FRET-pair will prompt energy transfer and show sensitized emission (acceptor emission upon donor excitation), leading to a single distance per protein (Fig. 3.1a). After purification and specific labeling, KvAP dimer channels are functionally reconstituted in lipid vesicles (Fig. 3.1d and see Experimental Procedures).

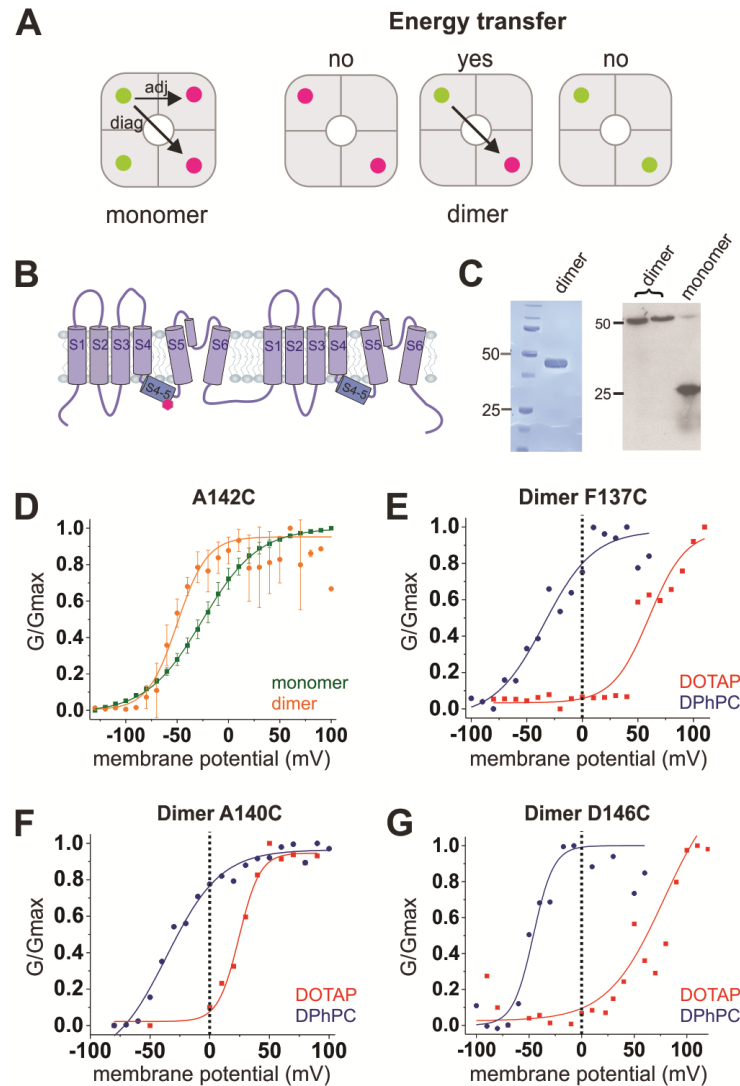


Figure 3.1: KvAP dimer and response to lipid environment changes. (A) A tetramer formed of monomers leads to four possible fluorophore binding sites, with the possibility of two energy transfer distances between the donor (*green*) and the acceptor (*fuchsia*): a smaller distance between two adjacent monomers (*adj*) and a larger one between two opposite monomers (*diag*). Use of a dimer of dimers leads to only two binding sites, located on opposite monomers. Only one combination of fluorophores will lead to an LRET signal, no energy transfer will occur between two donors or two acceptors. (B) The dimer of KvAP is formed by two monomers linked together by an intracellular loop. (C) Dimer expression was confirmed by SDS-PAGE (*left*) and immunoblotting (*right*). (D-G) Vesicles containing the channels are fused to a planar lipid bilayer. (D) Normalized conductance in function of the potential of the dimer (*orange*) confirmed that it retained its voltage dependence in a similar way than the monomer (*green*). (E-G) The midpoint activation potential of a N-terminal position (E), a middle position (F) and a C-terminal position (G) of the S4-S5 linkers in DOTAP environment (*red*) is shifted to more positive potentials, and the channels are mostly closed at 0 mV, whereas in a phospholipid environment (DPhPC, *blue*), they are mostly opened at 0 mV.

The investigation of voltage-gated ion channels with spectroscopic methods has always been hindered by the lack of control over the membrane potential. Also our LRET measurements are performed on KvAP channels reconstituted into liposomes in the absence of a membrane potential. Recently, more and more evidence indicated that the lipid environment has an important influence on channel behavior (17,40-42). In particular Schmidt et al. (18-20) showed that the state of the KvAP channel is dependent on the lipid environment. In typical phospholipid mixtures, the channels are open in the absence of a membrane potential. Adding increasing amounts of the cationic DOTAP to the membrane, however, shifts the voltage dependence to more positive potentials such that the open probability at 0 mV approaches zero at a DOTAP content of 67% (19). Here, we made use of this lipid dependence in order to control the state of the channel during our LRET recordings. The channels were reconstituted into vesicles comprised of DPhPC or DOTAP where KvAP channels reside in the open and closed state, respectively.

Due to the key role that the S4-S5 linker fulfills in electromechanical coupling, mutations in this region might influence channel function. Thus, we had to ensure that the labeled mutants were functional and that they followed the correct voltage dependence under both conditions (Fig. 3.1d-g). To this end, the reconstituted channels were fused into planar lipid bilayers formed of DPhPC and DOTAP, respectively. All dimer-mutants, except A144C, expressed functionally with no significant differences compared to wildtype KvAP. A145C did not show a clear pattern in the westernblot analysis, and the cysteine in I141C was weakly accessible. Both mutants were thus excluded from further analysis. As predicted, at 0 mV all other mutants were mostly open and closed when reconstituted in DPhPC and DOTAP, respectively (Fig. 3.1e-g). Channels in pure DOTAP vesicles fused in a pure DOTAP bilayer were functional, but the bilayer was very unstable. For this reason, bilayers of mixed lipids (25% DPhPC + 75% DOTAP) were used with DOTAP vesicles, still leading to closed channels at 0 mV. Interestingly, the nature of the bilayer seemed to have less influence than the vesicle composition, suggesting a strong interaction between the voltage sensor and the lipids which it came into contact with first.

3.3.2 LRET reveals position of S4-S5 linker in both Closed and Open State

Identical samples of labeled KvAP dimer mutants reconstituted in lipid vesicles were used for the bilayer experiments and the LRET measurements (Fig. 3.2). A lanthanide (Tb^{3+}) complex (Fig. 3.2a) was used as the donor whose characteristic long lifetime in the excited state (~ 1 ms) allowed detecting its temporal decay with high accuracy. More importantly, its fully isotropic emission evaded any inaccuracy due to the orientation between donor and acceptor typical for fluorescence-based RET (24). The comparison of the lifetimes in absence and presence of the acceptor reflects the efficiency of the energy transfer (see Experimental Procedures): if the acceptor is very close to the donor (closed state), then the energy transfer will be strong and the lifetime short and *vice versa* (Fig. 3.2b). We obtained cross-pore distances for seven positions along the S4-S5 linker in the open and closed position from LRET measurements on dimers reconstituted in DPhPC or in DOTAP, respectively (Table 3.1).

Position	Closed	Open	Kv 1.2/2.1	Position
F137C	33.4 ± 2.7	42.2 ± 0.3	<i>42.9</i>	<i>G309C</i>
L138C	42.8 ± 0.9	46.7 ± 0.6	<i>49.8</i>	<i>L310C</i>
S139C	40.2 ± 0.4	44.3 ± 1.4	<i>52.4</i>	<i>Q311C</i>
A140C	30.1 ± 0.5	35.4 ± 0.1	<i>38.0</i>	<i>I312C</i>
A142C	37.9 ± 1.5	47.8 ± 0.3	<i>48.3</i>	<i>G314C</i>
D143C	33.2 ± 1.1	42.4 ± 0.1	<i>39.8</i>	<i>L315C</i>
D146C	35.9 ± 0.3	41.9 ± 0.6	<i>44.4</i>	<i>K318C</i>

Table 3.1: Distances between opposite S4-S5 linkers. Cross-pore distances (\AA) for seven residues along the S4-S5 linker of a KvAP dimer were determined by LRET in the open and the closed state. Data are the average of at least $n=5$ for each state of every positions, with standard deviation as the error. Distances for the corresponding positions of Kv1.2/2.1 chimera were measured from the crystal structure (2R9R) in the open state and served as a comparison reference (*italic*).

The distances varied between 4 to 10 \AA for each position between the different lipid conditions, i.e. between the closed and the open state. The open-state distances, except S139C,

correlated well with the distances from the corresponding positions in the Kv1.2/2.1 chimera X-ray structure (PDB: 2R9R, Table 3.1, 43), indicating that our data reflect well the native conformation of the S4-S5 linker but, also, that the structure of Kv1.2/2.1 and KvAP in this region coincide. We ensured that the distances were independent of the specific donor-acceptor pair, by assessing distances with different acceptor fluorophores for the various positions (Table 3.2).

Dye	ATTO 465	Fluorescein	Alexa 488	TMR
R₀	30.6	42.7	43.4	50.8
F137C	45.3		42.6	
A142C			47.9	47.5
D143C		42.3	42.5	
D146C (O)		49.3	48.5	50.6
D146C (C)		36.3	35.9	

Table 3.2: Comparison of distances obtained with different acceptors. Distances (Å) between two opposite residues were obtained with different pair of fluorophores without any significant variations. First line indicates the different acceptors used in combination with the same lanthanide complex donor and second line indicates their respective R₀. Table shows an example of one experiment for 4 different positions in the S4-S5 linker of KvAP.

The distances among the different residues along the S4-S5 linker vary significantly but with a periodicity of 3-4 residues. These variations are caused by the helical structure of the S4-S5 linker and its orientation with respect to the pore. When projected onto a helical wheel, we observed that those residues pointing towards the central pore yielded the smallest cross pore distances, and vice versa (Fig. 3.2c). Following this logic, the residues F137, A140 and D143 are located toward the pore, while residues L138, S139 and A142 are oriented outward. The distance determined for the residue D146 does not fit perfectly the helical wheel, being

possibly explained by the fact that this residue is located at the C-terminal end of the linker, in the transition into the S5 segment. Based on these distance restraints and assuming an ideal alpha-helical conformation of the linker, we were able to predict the position and orientation of the helix in space relative to the pore in both open and closed state and to reconstruct the movement of the S4-S5 linker during gating (Fig. 3.2d).

When decomposed into four independent components (Fig. 3.2e), we observed a radial displacement of 3.4 Å, in combination with rotations of the S4-S5 linker around its own axis (12°), vertically (14°), i.e. normal to the membrane plane, and – less marked – horizontally (5°). Figure 3.2d displays the displacement of the S4-S5 linker during gating. The rotation is consistent with current models postulating a rotation of the S4 helix (44,45). According to our model, the S4 rotation seems to be translated into a rotation of the S4-S5 linker. Also, the rather small shift radially away from the central axis is in good agreement with predictions on the movement of the S4 helix (~5Å, 34). The channels are closed in the DOTAP environment, indicating that such a small movement is sufficient to allow and block ion conduction. In other words, limited linker displacement can open and close the internal gate of the Kv channels.

3.3.3 Atomistic model reveals closing of the pore by 3-4 Å displacement

Our “rigid helix” model assumes that the S4-S5 linker is a rigid, perfect alpha-helix, which does not necessarily have to be the case. In addition, the above model does not yet give any information about S4-S5 linker movements that are invariant in the diameter, i.e. rotations around the central axis of the channel and vertical translations of the entire linker. We also wanted to answer the question as to how the displacement of the S4-S5 linker leads to pore opening and closing. We therefore built a closed state model satisfying our experimentally obtained distances using molecular dynamics simulations. Starting with the open state structure of Kv1.2/2.1 (43), we used our closed state data as restraints and applied an electric field over the membrane. In order to more rapidly reach the resting state conformation of the voltage sensor domain, we used additional restraints that were previously reported (35,36, for details see Experimental Procedures). Under these conditions, the voltage sensor transitioned from the open state into its resting state and closed the ion conducting pore (Fig. 3.3a).

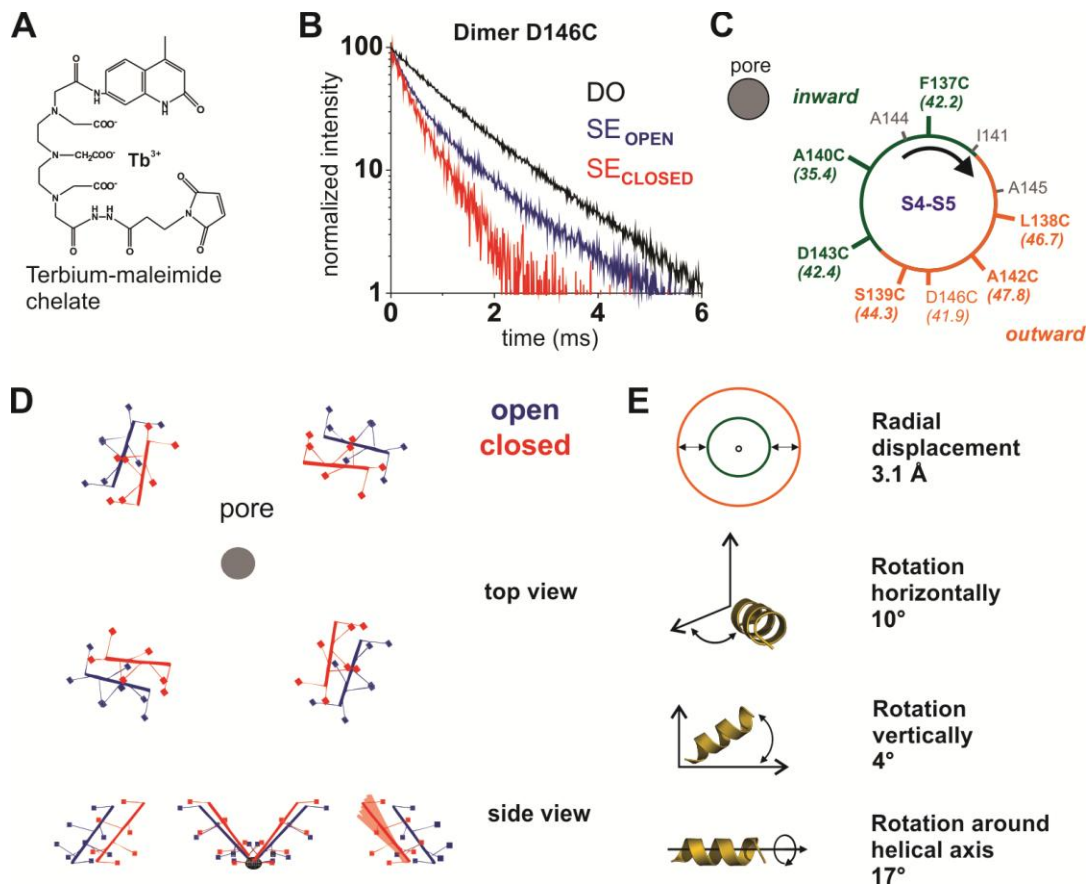


Figure 3.2: S4-S5 linker movement during gating determined by LRET measurements. (A) Structure of the lanthanide complex used as donor. (B) Acceptor-sensitized emission (SE) is shown for the D146C dimer reconstituted in DOTAP (red) and in DPhPC (blue). $\tau_{SE} = 285 \mu s$ for the closed state (red), $\tau_{SE} = 602 \mu s$ for the open state (blue). In black the control of donor in the absence of acceptor is shown ($\tau_{DO} = 1.17 ms$). (C) Residues of the S4-S5 linker of KvAP are projected on a helical wheel with an alpha-helical periodicity. The smallest experimental distances are from the residues on the inward side of the helix (green) with respect to the pore, and the largest ones, form the outward side (orange). (D) Top view of the movement of the S4-S5 linker shows the radial displacement and the horizontal rotation it undergoes from the open state (blue) to the closed state (red). Side view shows the vertical rotation. (E) The 3-dimensional movement of the S4-S5 linker is decomposed into four components.

During the gating movement, the S4 helix was pulled downward by about 9 Å and rotated by 24° (Fig. 3.3a). The S4-S5 linker was moved inward, which pushed the S6 into the central pore by about 4 Å (Fig. 3.3c). As speculated, the S4-S5 linker did not remain rigid but was “bent” slightly by the C-terminal end of S4. The angle between S4 and the linker increased from 67° to 104°, while the horizontal tilt of the S4-S5 linker was slightly larger than

predicted above (9°) probably due to the bending of the linker. The S4 had a 3_{10} -helical conformation C-terminal to R296 (Fig. 3.3b).

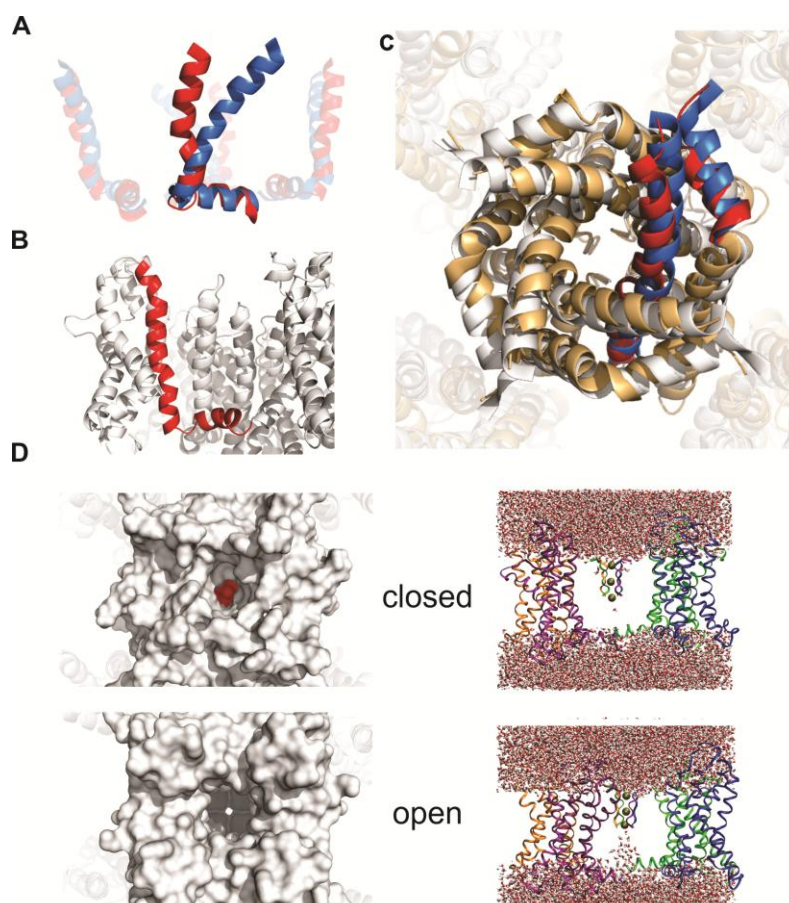


Figure 3.3: Closed state model satisfying LRET restraints. (A) From the open (*blue*) to the closed (*red*) state, the S4 helix undergoes a translocation of 9 \AA along its axis together with a rotation of 37° relative to the S4-S5 linker and of 24° around its own axis. (B) In its resting state, the lower S4 adopts a 3_{10} -helical conformation. The S4-S5 linker is slightly bent. (C) The 4 \AA radial displacement of the S4-S5 linker is transferred to the C-terminal part of the S6, therefore closing the internal gate. In white the open state crystal structure (2R9R), in light orange the closed state model is shown. One subunit is highlighted in *blue* (open) and *red* (closed). It shows the small displacement that is sufficient for pore closing. (D) The water-filled column is interrupted in the bottom part of the pore when the internal gate is closed in our model (*top*) compared to the open state (*bottom*). For clarity, only the voltage sensors, linkers and selectivity filter are shown. On the *left*, the view into the pore of closed model and open structure are shown. The pore is sealed by the ring of isoleucines I398 (highlighted in *red*) in the closed model whereas the selectivity filter is freely accessible in the open crystal structure (2R9R).

The movement of the S6 helix was less pronounced than expected previously. Therefore, we verified that the pore was indeed closed. Figure 3.3d shows the water molecules in the central pore in the open (*bottom*) and closed (*top*) conformation. In the closed conformation, the water column is disrupted at a hydrophobic ring at position I398 just above the PVP motif (Fig. 3.3d, left; highlighted in *red*), indicating that the channel is indeed closed and ion conduction interrupted. Thus, a small radial displacement of only 3-4 Å is sufficient to push the internal gate of Kv channels into a closed state and prevent ion conduction.

3.4 Discussion

In this study, we varied the composition of the lipid environment in order to control the state of Kv channels in the absence of a membrane potential. Using positively charged lipids modified the electric field around the voltage sensor such that the channel remains in its closed state even in the absence of a membrane potential. The use of lipids to control voltage-gated ion channels facilitated the use of spectroscopic methods for this class of membrane proteins. Interestingly, when fusing KvAP from vesicles into planar lipid bilayers, the composition of the lipid vesicles had a stronger influence than the composition of the bilayer itself. This suggests a tight interaction between protein and its immediate lipid environment and may have significant implications on lipid-induced regulation of the channels.

Using Lanthanide-based resonance energy transfer (LRET), we succeeded in determining the position of the S4-S5 linker in both the open and closed states with Å-resolution and obtained a model for Kv channels in their resting state satisfying these and previous restraints. This is, to our knowledge, the first closed state model based on restraints from the cytosolic face of the channel. In order to enter the closed state, the S4-S5 linker underwent a radial translation by 3-4 Å. It rotated around its own axis by 12° and tilted 14° vertically and 5° horizontally (Fig. 3.2e).

We also analyzed how the S4 helix in our model was displaced with respect to the open state structure since S4 helix and S4-S5 linker movements are tightly linked. In an interpolation between the open state crystal structure and our closed state model, the S4 is vertically translocated by 9 Å down along its axis, and tilts with respect to the S4-S5 linker from 67° in the open structure to 104° in our resting state model (Fig. 3.3a). These movements of S4 are accompanied by a rotation around its own axis by 24°. The rotation ensures that the arginines keep towards the lumen of the VSD, while the translation downwards brings the R4 below the Phe233. The parameters predicted for the S4 movement are consistent with previous models. Values for the vertical displacement of S4 vary between 6-10 Å (44,45) and 15 Å (34). The angle between S4-S5 linker was proposed to change by 40° from 60° to 100° (45) in accordance with our experimental data.

The C-terminal portion of the S4 adopted a 3_{10} -helical conformation starting with the arginine R296 as it had been observed in the crystal structure of the Kv1.2/2.1 chimera (43). The extent of the 3_{10} -helix coincided with those observed in the crystal structure and other closed-state models (46), despite the proposed transition from a 3_{10} - to an α -helix, or an extension of the 3_{10} -helix in the resting state (43,45,47,48). The extension of the 3_{10} -region, however, might occur upon longer simulation times, as suggested by Bjelkmar et al. (48).

The more important aim of our study, however, was to define the movement of the S4-S5 linker and the mechanism how this movement controls the internal gate of the Kv channels. Here, two features of the S4-S5 linker movement give significant insight into the gating process. First, the S4-S5 linker, and with it the internal gate (S6) are radially displaced by only 3-4 Å, and second, the S4-S5 linker is slightly bent in the resting state. The movement of the S4-S5 linker is initiated by the displacement of the S4 helix described above. In particular the tilt and the rotation of S4 are translated into a similar rotation and the bent in the S4-S5 linker. The relatively small radial displacement of the S4-S5 linker is translated to closing of the internal gate by 4 Å (Fig. 3.3c). The interaction is mediated by annealing of the S4-S5 linker to the C-terminal end of S6 (S6T, 9,10,11,13,14,49). The S4-S5 linker “presses” against the S6 at the level of its PVP-motif, and accordingly, the pore closes with a “hydrophobic seal” by pushing the isoleucine 398 residues into the pathway, excluding most water molecules from the central cavity in the closed state (Fig. 3.3d).

If such a small displacement of S6 is sufficient to interrupt the water-filled column in the ion conducting pathway, it raises the question whether all four S6 have to be in the closed position or whether a single S6 in the closed position is sufficient to disrupt the water pathway. The movement of the four VSDs in Kv channels is supposed to occur independently followed by the cooperative opening of the pore (50). This implies that the energy generated by the movement of the first three voltage sensors has to be stored in the system before the final opening step. The flexibility and bending of the S4-S5 linker could potentially provide the required “elasticity” to the system. Disruption of the conduction pathway by the transition of a single voltage-sensor, and with it of one S6, would offer an alternative explanation for the observed cooperativity. In this case, the actual conformational changes for the other three subunits may already have occurred when the last S6 opens and allows access to the pore.

However, this would contradict the suggested correlation of subconductance levels with partial opening (51), thus, this question will have to be addressed in direct measurements as performed for instance in KcsA (52).

3.5 Conclusion

In this study, we determined the movement of the S4-S5 linker during the gating process and established that a small radial movement of 4 Å is sufficient to control the cytosolic pore gate. Controlling the state of a voltage-gated potassium channel via its lipid environment opens up the possibility to investigate these channels with any spectroscopic method in both open and closed state even in the absence of a membrane potential.

3.6 Acknowledgments

We want to thank Mireille Marsolais for technical assistance and Drs. William Skene and Matthieu Starck for their help in synthesizing Tb-chelate.

3.7 References

1. Hille, B. (2001) *Ion channels of excitable membranes*, 3rd ed., Sinauer, Sunderland, Mass.
2. Ashcroft, F. (1999) *Ion channels and Disease*, Academic Press
3. Liman, E. R., Hess, P., Weaver, F., and Koren, G. (1991) *Nature* 353, 752-756
4. Papazian, D. M., Timpe, L. C., Jan, Y. N., and Jan, L. Y. (1991) *Nature* 349, 305-310
5. Aggarwal, S. K., and MacKinnon, R. (1996) *Neuron* 16, 1169-1177
6. Seoh, S. A., Sigg, D., Papazian, D. M., and Bezanilla, F. (1996) *Neuron* 16, 1159-1167
7. Blunck, R., and Batulan, Z. (2012) *Frontiers in pharmacology* 3
8. Long, S. B., Campbell, E. B., and MacKinnon, R. (2005) *Science* 309, 897-903
9. Lu, Z., Klem, A. M., and Ramu, Y. (2001) *Nature* 413, 809-813
10. Lu, Z., Klem, A. M., and Ramu, Y. (2002) *J.Gen.Physiol* 120, 663-676
11. Labro, A. J., Raes, A. L., Grottesi, A., Van, H. D., Sansom, M. S., and Snyders, D. J. (2008) *J.Gen.Physiol* 132, 667-680
12. Barghaan, J., and Bähring, R. (2009) *J.Gen.Physiol* 133, 205-224
13. Batulan, Z., Haddad, G. A., and Blunck, R. (2010) *J Biol Chem* 285, 14005-14019
14. Haddad, G. A., and Blunck, R. (2011) *J Gen Physiol* 137, 455-472
15. Blunck, R., Starace, D. M., Correa, A. M., and Bezanilla, F. (2004) *Biophys.J.* 86, 3966-3980
16. Xu, X. P., Erichsen, D., Borjesson, S. I., Dahlin, M., Amark, P., and Elinder, F. (2008) *Epilepsy research* 80, 57-66
17. Xu, Y., Ramu, Y., and Lu, Z. (2008) *Nature* 451, 826-829
18. Schmidt, D., Cross, S. R., and MacKinnon, R. (2009) *J.Mol.Biol.* 390, 902-912
19. Schmidt, D., Jiang, Q. X., and MacKinnon, R. (2006) *Nature* 444, 775-779
20. Schmidt, D., and MacKinnon, R. (2008) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 105, 19276-19281
21. Borjesson, S. I., and Elinder, F. (2011) *J Gen Physiol* 137, 563-577
22. Borjesson, S. I., Hammarstrom, S., and Elinder, F. (2008) *Biophys J* 95, 2242-2253

23. Blunck, R., Scheel, O., Muller, M., Brandenburg, K., Seitzer, U., and Seydel, U. (2001) *J.Immunol.* 166, 1009-1015
24. Selvin, P. R. (2002) *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 31, 275-302
25. Richardson, J., Blunck, R., Ge, P., Selvin, P. R., Bezanilla, F., Papazian, D. M., and Correa, A. M. (2006) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 103, 15865-15870
26. Posson, D. J., Ge, P., Miller, C., Bezanilla, F., and Selvin, P. R. (2005) *Nature* 436, 848-851
27. Chen, J., and Selvin, P. R. (1999) *Bioconjugate chemistry* 10, 311-315
28. Ge, P., and Selvin, P. R. (2003) *Bioconjugate chemistry* 14, 870-876
29. MacKerell, A. D., Bashford, D., Bellott, M., Dunbrack, R. L., Evanseck, J. D., Field, M. J., Fischer, S., Gao, J., Guo, H., Ha, S., Joseph-McCarthy, D., Kuchnir, L., Kuczera, K., Lau, F. T. K., Mattos, C., Michnick, S., Ngo, T., Nguyen, D. T., Prodhom, B., Reiher, W. E., Roux, B., Schlenkrich, M., Smith, J. C., Stote, R., Straub, J., Watanabe, M., Wiorkiewicz-Kuczera, J., Yin, D., and Karplus, M. (1998) *Journal of Physical Chemistry B* 102, 3586-3616
30. Im, W., Feig, M., and Brooks, C. L., 3rd. (2003) *Biophys J* 85, 2900-2918
31. Jo, S., Kim, T., Iyer, V. G., and Im, W. (2008) *Journal of computational chemistry* 29, 1859-1865
32. Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R. D., Kale, L., and Schulten, K. (2005) *Journal of computational chemistry* 26, 1781-1802
33. Brooks, B. R., Brooks, C. L., 3rd, Mackerell, A. D., Jr., Nilsson, L., Petrella, R. J., Roux, B., Won, Y., Archontis, G., Bartels, C., Boresch, S., Caflisch, A., Caves, L., Cui, Q., Dinner, A. R., Feig, M., Fischer, S., Gao, J., Hodoscek, M., Im, W., Kuczera, K., Lazaridis, T., Ma, J., Ovchinnikov, V., Paci, E., Pastor, R. W., Post, C. B., Pu, J. Z., Schaefer, M., Tidor, B., Venable, R. M., Woodcock, H. L., Wu, X., Yang, W., York, D. M., and Karplus, M. (2009) *Journal of computational chemistry* 30, 1545-1614
34. Jensen, M. O., Jogini, V., Borhani, D. W., Leffler, A. E., Dror, R. O., and Shaw, D. E. (2012) *Science* 336, 229-233
35. Campos, F. V., Chanda, B., Roux, B., and Bezanilla, F. (2007) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 104, 7904-7909
36. Lin, M. C., Abramson, J., and Papazian, D. M. (2010) *J Gen Physiol* 135, 415-431
37. Cha, A., Snyder, G. E., Selvin, P. R., and Bezanilla, F. (1999) *Nature* 402, 809-813
38. Sandtner, W., Bezanilla, F., and Correa, A. M. (2007) *Biophys.J.* 93, L45-L47

39. Liu, Y. S., Somporpisut, P., and Perozo, E. (2001) *Nat.Struct.Biol.* 8, 883-887
40. Ramu, Y., Xu, Y., and Lu, Z. (2007) *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 6448-6453
41. Ramu, Y., Xu, Y., and Lu, Z. (2006) *Nature* 442, 696-699
42. Zheng, H., Liu, W., Anderson, L. Y., and Jiang, Q. X. (2011) *Nature communications* 2, 250
43. Long, S. B., Tao, X., Campbell, E. B., and MacKinnon, R. (2007) *Nature* 450, 376-382
44. Vargas, E., Bezanilla, F., and Roux, B. (2011) *Neuron* 72, 713-720
45. Yarov-Yarovoy, V., DeCaen, P. G., Westenbroek, R. E., Pan, C. Y., Scheuer, T., Baker, D., and Catterall, W. A. (2012) *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, E93-102
46. Khalili-Araghi, F., Jogini, V., Yarov-Yarovoy, V., Tajkhorshid, E., Roux, B., and Schulten, K. (2010) *Biophys J* 98, 2189-2198
47. Villalba-Galea, C. A., Sandtner, W., Starace, D. M., and Bezanilla, F. (2008) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 105, 17600-17607
48. Bjelkmar, P., Niemela, P. S., Vattulainen, I., and Lindahl, E. (2009) *PLoS computational biology* 5, e1000289
49. Long, S. B., Campbell, E. B., and MacKinnon, R. (2005) *Science*
50. Zagotta, W. N., Hoshi, T., and Aldrich, R. W. (1994) *J.Gen.Physiol* 103, 321-362
51. Chapman, M. L., and VanDongen, A. M. (2005) *J.Gen.Physiol* 126, 87-103
52. Blunck, R., McGuire, H., Hyde, H. C., and Bezanilla, F. (2008) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 105, 20263-2026

**DO LIPIDS SHOW STATE-DEPENDENT AFFINITY TO THE VOLTAGE-GATED
POTASSIUM CHANNEL KVAP?**

Élise Faure^{1,3}, Christine Thompson^{1,2} and Rikard Blunck^{1,2,3}

¹Groupe d'étude des protéines membranaires (GÉPROM), Departments of ²Physics and ³Physiology, Université de Montréal, Montréal, Canada

Manuscrit publié:

The Journal of Biological Chemistry, 2014 June 6, 289 (23):16452-61

Contribution des auteurs:

EF: participation au design expérimental, production des échantillons, prise des mesures d'électrophysiologie, analyse des données, modèle cinétique, interprétation des résultats, écriture de l'article

CT: prise de mesures d'électrophysiologie

RB: design expérimental, modèle cinétique, interprétation des résultats, écriture de l'article

Résumé

Comme toutes les protéines membranaires intégrales, les canaux ioniques dépendants du voltage sont insérés dans une membrane lipidique qui régule leur fonction soit grâce à leurs propriétés physico-chimiques, soit par liaison directe. Comme la manipulation de la composition lipidique des cellules est difficile, nous avons investigué l'influence de plusieurs lipides sur le canal purifié KvAP reconstitué dans des bicouches de composition connue. Les lipides utilisés ont engendré deux effets distincts et indépendants: les lipides interagissant dans la région du pore diminuent la barrière énergétique des transitions finales d'activation alors que les lipides liés au senseur de voltage déplacent la courbe conductance-voltage en fonction de leur charge électrostatique. De plus, la valeur d'activation à mi-parcours n'est déterminée que par les lipides avec lesquels les canaux entrent en contact immédiatement après la purification. Par la suite, ceux-ci ne semblent pouvoir être échangés que dans l'état ouvert. La grande affinité des lipides pour leur site de liaison a des implications non seulement au niveau de notre compréhension du mécanisme de *gating*, mais également au niveau du design expérimental de toute étude visant à déterminer l'influence des lipides sur les canaux ioniques.

Abstract

As all integral membrane proteins, voltage-gated ion channels are embedded in a lipid matrix that regulates their channel behavior either by physicochemical properties or by direct binding. Since manipulation of the lipid composition in cells is difficult, we investigated the influence of different lipids on purified KvAP channels reconstituted in planar lipid bilayers of known composition. Lipids developed two distinct and independent effects on the KvAP channels; lipids interacting with the pore lowered the energy barriers for the final transitions whereas voltage sensor-bound lipids shifted the midpoint of activation dependent on their electrostatic charge. Above all, the midpoint of activation was determined only by those lipids, the channels came in contact with first after purification and can seemingly only be exchanged if the channel resides in the open state. The high affinity of the bound lipids to the binding site has implications not only on our understanding of the gating mechanism but also on the general experimental design of any lipid dependence study.

Background: Voltage-gated potassium channels are regulated by their lipid environment.

Results: The first lipids KvAP-channels come in contact with can only be exchanged if the channel is in the open state.

Conclusion: Lipids bound to Kv-channels are accessible only in a state-dependent manner.

Significance: The high affinity between lipids and integral membrane protein suggests that both should be treated as one complex.

Keywords : Kv channels, lipid regulation, DOTAP, electrophysiology

4.1 Introduction

Voltage-gated potassium (K_v) channels play an important role in the repolarization of excitable membranes in nerve and muscle cells. They sense the membrane potential by four peripheral voltage sensing domains (VSD) arranged around a single ion conducting pore (1,2). Each VSD comprises four helical transmembrane segments (S1-S4), which undergo conformational changes upon membrane depolarization driven by the positively charged arginine-rich S4 helix. This movement is energetically coupled to the pore helices (S5-S6) and triggers pore opening (reviewed in 3).

Recent studies suggested that the surrounding lipid matrix strongly affects K_v channel activity. Lipids with negatively charged headgroups in the vicinity of the channels shifted activation to lower potentials whereas positively charged headgroups had the opposite effect (4-7). A similar effect was observed when enzymatically digesting the positively charged choline in sphingomyelin, leaving only the negatively charged phosphate behind (8-10).

The lipid dependence of channel function can be used to regulate the state of the channels in the absence of a membrane potential, making them available for spectroscopic measurements. It has been confirmed that voltage- and lipid-controlled open and closed states are equivalent (7,11). The outermost arginines are suggested to interact with the headgroups of the surrounding phospholipids in order to stabilize themselves in the low dielectric membrane environment and facilitate the movement of the VSD from resting to the activated state (2,4,8,9,12,13). Accordingly, a binding site for negatively-charged poly-unsaturated-fatty-acids (PUFAs) has been identified in the vicinity of the outer arginines in the VSD of Shaker channels (14). Nevertheless, Zheng et al. (11) reported that the phosphate-arginine interaction is not required for the lipid-induced conformational changes of the VSD. Instead, lipids immediately around the VSD would contribute to the lipid-dependent gating by forming a functional unit with the ion channels.

Evidence for tight interactions between the annular lipids and the ion channels also derive from structural observations. X-ray structures of the paddle chimera $Kv1.2/2.1$ and of the voltage-gated sodium channels NavAb resolved several lipid molecules bound between the VSDs and pore interface and between adjacent VSDs (2,15). Solid state NMR studies have

shown that the VSDs interact extensively with both the hydrophobic acyl chain and the headgroup region of phospholipids (16,17), but also that the lipids influence the pore structure (18,19).

Here, we investigated the influence of different lipids as well as their affinity to KvAP channels. We found two distinct and independent effects on the voltage-dependent activation provoked by the annular or bound lipids interacting with the voltage sensor domain and cytosolic pore region, respectively. The lipids bound to the voltage sensor domain seem to influence the equilibrium between the closed and open state and, thus, vary the $V_{1/2}$ of the conductance voltage relation whereas lipids at the cytosolic side affect the energy barriers of pore opening and entry into the inactivated state. The shift of activation potential shows preferential affinity for the initial lipids and state-dependent exchange of the lipids.

4.2 Experimental Procedures

4.2.1 KvAP channel purification and reconstitution in lipid vesicles

KvAP coding sequence was inserted in the pQE70 vector (Quiagen) and expressed in M15 *E. coli* strain cell (Quiagen). Cultures were grown in LB medium with 100 µg/mL ampicillin and 25 µg/mL kanamycin. At $A_{600} = 0.6$, channel expression was induced with 0.5 mM isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside (Biolynx) and 5% glycerol (Sigma) and 10 mM BaCl₂ (Fisher Scientific) were also added. Temperature was lowered to 25°C during expression. After 3 to 5 hours bacterial cells were harvested and lysed by pressure (15,000 psi) with an EmulsiFlex-C5 (Avestin). Membranes were isolated by centrifugation at 200 000 x g and solubilized with 2% decyl-maltoside (Anatrace) for 1 hour at 4°C. The sample was bound to a cobalt affinity column (Talon Superflow, Clontech) and washed with 15 mM imidazole (Sigma) before elution with 400 mM imidazole. The sample was maintained in a 200 mM NaCl, 50 mM KCl, 50 mM Hepes, pH 7.4 buffer containing 0.25% decyl-maltoside. Presence and purity of the channel were assessed by immunoblotting and Comassie staining.

Small unilamellar vesicles (SUV) were prepared by vigorous sonication with the different lipids: DPhPC (1,2-diphytanoyl-glycero-3-phosphocholine), DOTAP (1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane), POPS (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine), POPE (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), POePC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine), POPG (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (Avanti Polar Lipids). The SUVs were mixed with the sample at a ratio of 1:5 protein:lipid (w/w) at a final concentration of 10 mg/mL, well vortexed, shortly sonicated and rocked for 1 hour at room temperature. This sample was loaded in a dialysis device to exchange the detergent (Slide-A-Lyzer MINI 20K MWCO, Pierce) and kept at 4°C. Dialysis buffer (450 mM KCl, 10 mM Hepes, pH 7.4) was exchanged twice a day for 5 days.

4.2.2 Electrophysiology recordings

Lipids were dissolved in decane at 25 mg/mL to form planar bilayers over an aperture of 250 µm in polymer partition that separates two chambers with symmetric solutions (150 mM KCl, 10 mM Hepes, pH 7.4) (20). Vesicles containing the channels were shortly

sonicated and fused to the voltage-clamped bilayer. 0.25 μ M sorbitol was variably added to the vesicles before sonication to help the fusion. The elicited macroscopic currents were recorded with an Axiovert 1D amplifier (Axon instruments) and registered using “GPatch”. When sufficient current was observed, the bilayer chamber was carefully washed. Holding potential was -100 mV and the bilayer was depolarized until 100 mV in 10 mV increment, with a waiting interval of 100 seconds between each depolarizing pulse (at holding potential). For measurements at higher temperatures, a heating block with temperature feedback was used. Recordings were analyzed using “Analysis”, and activation curves were fit to a single Boltzmann distribution using the following equation:

$$G/G_{max} = \frac{1}{1 + \exp((x - V_{1/2})/V_s)}$$

4.3 Results

4.3.1 Limited exchange of annular lipids around KvAP

Purified KvAP were reconstituted into small unilamellar lipid vesicles composed of different common phospholipids. Both POPS (phosphoserine) and POPG (phosphoglycerol) bear one net negative charge in their headgroup, while POPE (phosphoethanolamine) and DPhPC (methylated tail phosphocholine) are zwitterionic and carry no net charge (Fig. 1d). Although not found in nature, DPhPC is widely used to form bilayers and has a high mechanical and chemical stability. POePC (ethylphosphocholine) and DOTAP (trimethylammonium-propane) both carry a net positive charge in their headgroup. In POePC, the phosphate group is ethylated whereas the phosphate has been removed in DOTAP. Primarily used for cell transfection, DOTAP has been shown to shift the voltage dependence of KvAP to more positive potentials, most likely by favoring the resting state of the VSD (4,7,11). Although DOTAP is not a phospholipid, KvAP reconstituted in pure DOTAP vesicles has been shown to adopt the native closed state conformation of the protein (7,11,16).

In previous work (7), we noticed that the lipid composition of the proteoliposomes seems to play a more important role than that of the bilayer. This led us to the question whether interaction between voltage-gated ion channels and lipids is mediated via a high-affinity binding site or whether it is a more indirect influence via the lipid environment. To investigate this question in more detail, we fused KvAP-proteoliposomes formed of DPhPC, POPE:POPG (3:1) and DOTAP into painted lipid bilayer of variable lipid composition and obtained the conductance-voltage relations (GV; Fig. 4.1). A striking observation when comparing the voltage dependencies of pore opening was that the GVs shifted according to the lipids in the vesicles not in the bilayer (Table 4.1). For instance, DOTAP vesicles evidently shifted the GV to more positive potentials and resulted in a $V_{1/2} = (-4.3 \pm 1.9)$ mV even in pure DPhPC bilayers. Vice versa, the GV was found at $V_{1/2} \approx -40$ mV for vesicles formed of POPE:POPG or DPhPC irrespective of the bilayer composition. Unfortunately, no values are available for DOTAP vesicles fused to a DOTAP bilayer. Although the channels remained functional and yielded macroscopic current, fusion was very poor. Additionally, pure DOTAP bilayers did not remain stable long enough to achieve sufficient fusion and to then record a complete

voltage-dependence protocol. We therefore used the mixture DOTAP:DPhPC 2:1, which allowed us to gain reasonable bilayer stability to support insertion of sufficient channels to obtain a conductance-voltage relation.

The positive shift of the conductance voltage relation was not specific for DOTAP. When we fused vesicles formed of POPS (negatively charged) and POePC (positively charged) into bilayers formed of DPhPC, the conductance-voltage relations were shifted to more negative and positive potentials, respectively, indicating that the electrostatic charge of the lipid headgroups plays a significant role, as proposed previously (Fig. 4.1a, Table 4.1) (4,8). However, the differences between PG and PS and between DOTAP and POePC suggest that the chemical structure and charge distribution also influence the voltage dependence of the channels.

In all cases, the bilayer composition had very little to no effect on the midpoint of activation. This would suggest very limited exchange between the annular lipids immediately surrounding the channels and the “bulk” lipids in the bilayer. In order to ensure that vesicle fusion had no substantial influence on bulk lipid composition, we estimated the surface area of bilayer and fused vesicles. If we consider an exaggerated number of 1000 fusion events to a bilayer with 250 μm diameter during a typical experiment, the surface ratio of vesicles versus bilayers would remain below 0.01%¹. At this low fraction, the influence of the vesicle lipids would be negligible with respect to the bulk lipids in a homogeneous mixture. The lipid “patch” created by a vesicle would have double the radius of the original vesicle. With diffusion constants in the range of 20 $\mu\text{m}^2/\text{s}$, a complete exchange should occur within seconds (21). Both estimations indicate that the lipids surrounding the ion channels remain in close contact and do not diffuse into the main bilayer.

¹ The surface ratio between 1000 spheres (vesicles) of a typical radius $r_1=50\text{ nm}$ and a circle (bilayer) of radius $r_2=250\mu\text{m}$ is $1.6\times 10^{-4} < 0.01\%$. If we calculate with an upper limit for the SUV radius of $r_1 = 200\text{ nm}$, the ratio would still remain below 0.3%.

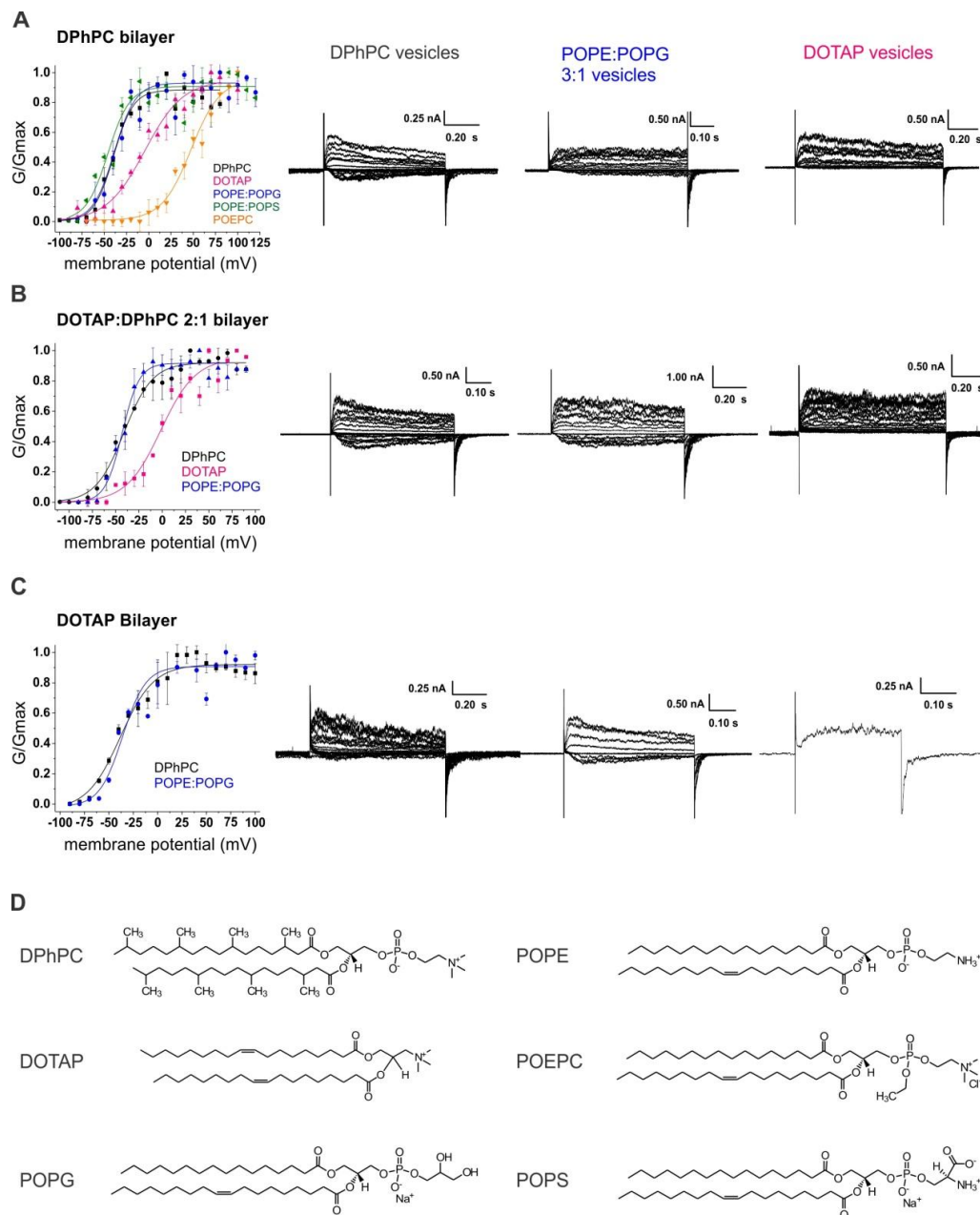


Figure 4.1. Conductance-voltage relations of KvAP in variable lipid conditions. KvAP channels were reconstituted in small unilamellar vesicles of DPhPC (*black*), POPE:POPG 3:1 (*blue*), DOTAP (*pink*), POPE:POPG:POPS 5:3:2 (*green*) and POEPC (*orange*) and fused to (A) a pure DPhPC planar lipid bilayer, (B) a DOTAP:DPhPC 2:1 bilayer and (C) a pure DOTAP bilayer. Voltage ranged from -100 mV to +100 mV with increments of 10 mV. Holding potential was kept at -100 mV. A single Boltzmann function was fit to the data (solid lines) and the activation parameters $V_{1/2}$ and V_S are presented in Table 4.1. Number of assays for each condition ranged from $n=2-7$, error bars are S.D. For each bilayer condition, current traces are displayed for vesicles of DPhPC, POPE:POPG 3:1 and DOTAP (from left to right). (D) Structures of DPhPC, DOTAP, POPG, POPE, POEPC and POPS.

In spite of the small surface area of the vesicle membrane, the differences in the physicochemical parameters of the lipids may slow down diffusion significantly. However, even 60 minutes after fusion of the vesicles, the conductance-voltage relations were not altered independent of the lipid composition of bilayer and vesicles (Fig. 4.2a). We then verified whether the lack of mixing between DOTAP and DPhPC could be overcome by increasing the temperature and, thereby, the mobility of the lipids. Since neither of these two lipids have a phase transition in the physiological temperature range, we were able to perform bilayer measurements up to $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ without changing packing geometry. As shown in figure 4.2b, no temperature-related effect was noticed on either the midpoint or the steepness of the GV curves (Table 4.2). These results seem to indicate that the lipids that come into first contact with the protein have a high affinity to the protein and are thus not easily exchanged. Even at increased temperature and after longer time, the activation behavior persisted, suggesting either a strong channel-lipid interaction or a confinement of lipid molecules to a “microdomain” around the channel. Such “microdomains” have been suggested previously based on results obtained from channels expressed in *Xenopus* oocytes (9).

KvAP in the cationic DOTAP or POePC had a significantly shallower GV than in DPhPC or POPE:POPG. Although both effects, shift of the midpoint of activation and the change in steepness, might have been caused by the same mechanism, it seems that they occur independently of one another. When DPhPC vesicles were fused to DOTAP bilayers, we noted a small but clear steepness decrease in the activation curve despite not having any effect on the $V_{1/2}$ (Fig. 4.2c). The V_S value increased by 6 mV to 17.1 ± 2.3 mV. Such a shallow voltage dependence was also observed when KvAP was reconstituted in DOTAP vesicles ($V_S > 18$ mV). Although this was a subtle effect, it was emphasized in the onset of activation, which was shifted such that currents were observed at more negative potentials (Fig. 4.2c, *right*). While the V_S values for DPhPC vesicles increased with higher DOTAP content in the bilayer, the reverse effect was not observed, i.e. DPhPC in the membrane did not render the activation steeper for the DOTAP vesicles (Fig. 4.1, Table 4.1). Similarly, presence of DOTAP in the bilayer had no effect on KvAP in the POPE:POPG mixture vesicles, which we will discuss later on.

Bilayer	VESICLES						
	DPhPC	POPE:POPG 3:1	DOTAP	POePC	PC:PE:POPS 5:3:2	DOTAP 50% DPhPC 50%	DOTAP 75% DPhPC 25%
DPhPC	-39.3 ± 1.9 <i>11.0 ± 1.6</i>	-38.6 ± 4.0 <i>11.9 ± 3.2</i>	-4.3 ± 1.9 <i>21.5 ± 4.1</i>	47.5 ± 3.7 <i>16.4 ± 2.7</i>	-45.8 ± 3.9 <i>12.2 ± 2.8</i>	-	-
DOTAP:DPhPC 2:1	-41.1 ± 2.4 <i>15.3 ± 2.3</i>	-43.0 ± 2.3 <i>9.1 ± 1.6</i>	-1.5 ± 3.9 <i>18.6 ± 3.5</i>	-	-	-40.3 ± 3.3 <i>13.3 ± 3.1</i>	-41.4 ± 3.5 <i>17.7 ± 2.9</i>
DOTAP	-38.2 ± 2.6 <i>17.1 ± 2.3</i>	-36.0 ± 1.7 <i>11.8 ± 2.5</i>	-				
DOTAP 90% POPG 10%	-	-	-23.2 ± 2.5 <i>19.2 ± 2.5</i>				
DOTAP 80% POPG 20%	-	-	-46.6 ± 2.2 <i>9.5 ± 1.4</i>				

Table 4.1. Midpoint of activation ($V_{1/2}$) and steepness degree (V_s) of KvAP conductance-voltage relations (mV). $V_{1/2}$ (top) and V_s (bottom, *italic*) are presented for each bilayer and vesicles conditions assessed. Parameters in light grey boxes correspond to the single Boltzmann fits of the data presented in Figure 1 and show that the $V_{1/2}$ values are dependent on the vesicles lipid content. (n=2-7, light grey) $V_{1/2}$ values in the light blue boxes show a clear preference for DPhPC in pre-mixed vesicles of DOTAP and DPhPC. (n=2). $V_{1/2}$ and V_s values in light green boxes show titration of both DOTAP effects by addition of POPG in the bilayer. (n=3) Error on values are S.E.M.

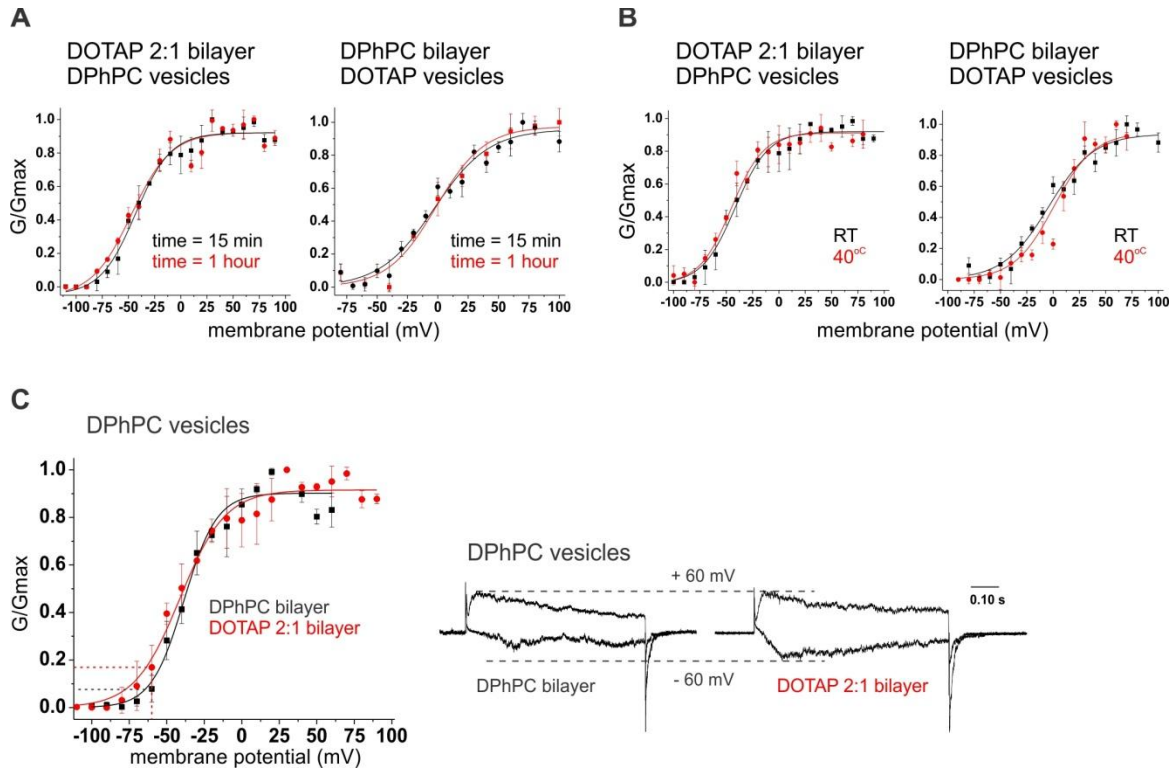


Figure 4.2. Lack of exchange between vesicles and bilayer lipids and bulk effect of DOTAP on DPhPC vesicles (A) Lipids from the bilayer do not over time mix with lipids from the vesicles. DPhPC and DOTAP vesicles containing KvAP fused to a DOTAP:DPhPC 2:1 bilayer (left) and to a DPhPC bilayer (right), respectively, are incubated for 15 minutes (black) or one hour (red) at a holding potential of -100 mV. In both cases, no significant change of the GV was observed. (B) Increase of the temperature does not promote the mixing between the lipids of the bilayer and the vesicles. DPhPC and DOTAP vesicles containing KvAP were fused to a DOTAP:DPhPC 2:1 bilayer (left) and to a DPhPC bilayer, respectively (right). The bilayers were kept at room temperature (black) or between 35°C and 40°C (red). No significant changes indicated lipid mixing between DOTAP and DPhPC at higher temperature. $V_{1/2}$ and V_S values are presented in Table II (n=2-4). (C) The voltage-dependence of KvAP reconstituted in DPhPC vesicles was shallower when fused to a DOTAP:DPhPC 2:1 bilayer (red) than to a DPhPC bilayer (black). Current traces show one normalized pulse at a saturating voltage (+60 mV) and one less depolarizing pulse where the difference of steepness of the GV curves creates a difference in the open probability (-60 mV, dotted lines). The data are fit with a single Boltzmann function (solid lines, Table I), n=3 and 7, error bars are SD.

DPhPC vesicles in DOTAP 2:1 bilayer				DOTAP vesicles in DPhPC bilayer				
15 min	1 hour	22°C	40°C	15 min	1 hour	22°C	40°C	30 min (+80 mV)
-40.6 ± 2.6	-41.8 ± 2.3	-41.1 ± 2.4	-45.2 ± 2.9	-2.8 ± 2.2	-1.3 ± 3.6	-4.3 ± 1.9	1.0 ± 2.7	-16.5 ± 2.6
<i>16.7 ± 2.4</i>	<i>16.8 ± 2.9</i>	<i>15.3 ± 2.3</i>	<i>15.2 ± 2.7</i>	<i>22.5 ± 2.0</i>	<i>19.7 ± 3.0</i>	<i>21.5 ± 4.1</i>	<i>19.0 ± 2.0</i>	<i>19.6 ± 2.2</i>

Table 4.2. Midpoint of activation ($V_{1/2}$) and steepness degree (V_S) of conductance-voltage relations of KvAP in function of time, temperature and state (mV). $V_{1/2}$ (top, normal) and V_S (bottom, *italic*) are presented for different conditions of time, temperature or holding potential for the lipid conditions indicated. Unless specified, the voltage was held at -100 mV during the experiments. Number of experiments ranged from n=2-5, errors are S.E.M.

4.3.2 KvAP shows preferential affinity to DPhPC

According to the above results, it seems that an interaction develops between the channel and the lipids during reconstitution of KvAP into the vesicles when detergent micelles are exchanged for lipid molecules. These lipids cannot be exchanged afterwards, neither by exposing the channels to high concentrations of a different lipid; nor by increasing the incubation time or temperature. The most striking result, however, was that exchange occurs in neither direction, neither from DOTAP to DPhPC nor the other way around. To determine which lipid shows a higher affinity when exposing the isolated KvAP in detergent to pre-mixed lipid compositions, we reconstituted KvAP in vesicles of variable ratios of DOTAP and DPhPC. Up to a 3:1 ratio DOTAP:DPhPC in the vesicles, KvAP followed a GV with a negative $V_{1/2}$ corresponding to DPhPC vesicles (Fig. 4.3a). Again, presence of DOTAP was translated only by the shallower voltage dependence of the activation curves (Table 4.1). These results indicate that KvAP has a marked affinity for DPhPC over DOTAP. The higher affinity for DPhPC might be explained by the lack of the presumably stabilizing phosphate headgroup in the non-phospholipid DOTAP. However, in spite of this natural preference for DPhPC when simultaneously exposed, in the bilayer, it cannot displace DOTAP molecules originating from the vesicles, indicating a very low dissociation rate from the proposed binding site(s) at the VSD (Fig. 4.1a).

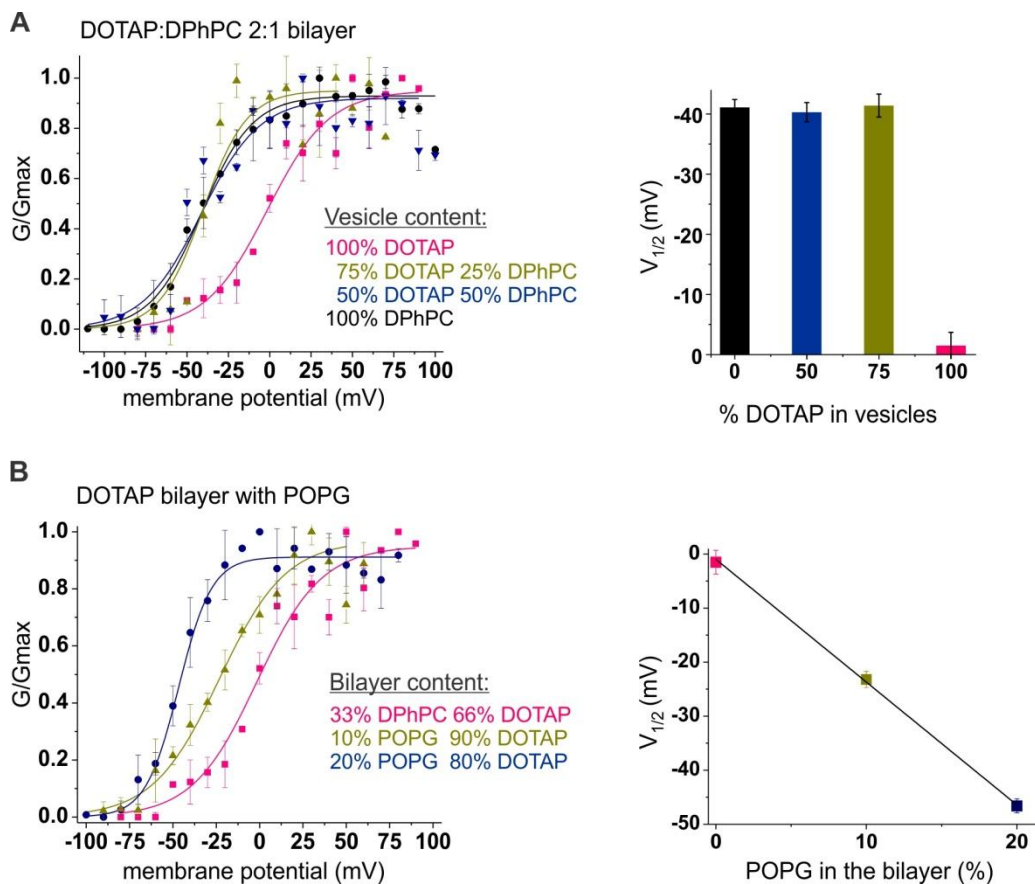


Figure 4.3. KvAP lower affinity for DOTAP and titration of its effects by POPG. (A) Preferential affinity of KvAP for DPhPC over DOTAP within vesicles. KvAP channels were reconstituted in vesicles containing an increasing amount of DOTAP mixed with DPhPC: 0% (*black*), 50% (*blue*), 75% (*green*) and 100% (*pink*) DOTAP vesicles were fused to a DOTAP:DPhPC 2:1 bilayer. No change in the midpoint of activation of the conductance-voltage relations could be related to the increase of DOTAP concentration up to 75% in the pre-mixed vesicles. Data were fit with a single Boltzmann function (solid lines, Table I) and $V_{1/2}$ values are presented in the right panel. Number of assays are $n = 2-7$ and error bars are SD. (B) Addition of negative charged POPG in the bilayer titrates DOTAP effects. KvAP channels reconstituted in DOTAP vesicles were fused to a DOTAP bilayer containing 10% (*green*) or 20% (*blue*) POPG. For comparison, KvAP in DOTAP vesicles fused to DOTAP:DPhPC 2:1 bilayer (*pink*) is shown. 10% of POPG in the bilayer is enough to shift the $V_{1/2}$ value, but the V_S value is not yet affected. With 20% of negative charges in the bilayer, the $V_{1/2}$ and V_S values are both restored to the POPE:POPG vesicles ones. The effect of DOTAP neutralization by POPG on the $V_{1/2}$ is shown in the right panel. Values are shown in Table I, $n=3-4$, error bars are SD.

4.3.3 DOTAP effect is titrated by negative charged phospholipids (POPG)

In order for the very high positive surface potential of DOTAP (22) to modulate the electric field around KvAP (7), DOTAP has to enter into very close proximity of the channels. From here, it seems, they cannot be displaced once bound. The low dissociation rate and the fact that the bulk lipids influence the GV steepness indicate that a binding site rather than a “microdomain” is responsible for the shift of the GV. But can we also influence the $V_{1/2}$ directly from the bulk lipids? To answer this, we tested whether the positive charges of DOTAP may be titrated by addition of negative charges into the bulk bilayer. The positive charge in DOTAP is located at the position of the negatively charged phosphate groups of the phospholipids. If the lipids can freely diffuse also around the channel, the anionic POPG (Fig. 4.1d) should be able to neutralize one or both effects of the cationic DOTAP. We added increasing percentages (10% and 20%) of POPG directly in a bilayer formed otherwise only of DOTAP and fused pure DOTAP vesicles into these bilayers (Fig. 4.3b). The $V_{1/2}$ shifted linearly with increasing POPG content until, at 20% POPG in the bilayer, the effects of DOTAP on KvAP were neutralized. $V_{1/2}$ and V_S values corresponded to the ones of POPE:POPG vesicles fused to a DOTAP bilayer (Table 4.1). At 10% POPG, the $V_{1/2}$ adopted an intermediate value and the slope was not yet affected.

The fact that we were able to neutralize the effect of DOTAP with POPG confirms that the lipids can diffuse – at least to a certain extent – between the bulk bilayer and the vesicle lipids. It also confirms the hypothesis that the positive charge plays the decisive role, as titration with a counter charge neutralized the DOTAP effects. We cannot be sure whether POPG displaces DOTAP from the presumed binding site or whether it occupies a site as closest neighbor and thus neutralizes the electrostatic charge of a “bound” DOTAP. The functional effects would be alike. The titration explains, however, why no increase in the slope upon addition of DOTAP was observed in POPE:POPG bilayers but in DPhPC bilayers (Fig. 4.1). The DOTAP in the bulk lipids would be neutralized by the POPG in the microenvironment..

4.3.4 Access to the lipid binding site in Kv channels seems to be state-dependent

The preferential affinity of KvAP to the initial lipids may be explained if the presumed binding site was only accessible when the channels are in detergent micelles. The binding site

might have a higher accessibility or a lower affinity in the open than in the closed state. In detergent micelles, the channels would not be exposed to any membrane potential and would, thus, be in the open state, whereas they would be closed once a negative membrane potential is applied. Jensen et al. (23), for instance, suggested that the entire VSD turns and separates from the pore during gating. It is also known that the VSD undergoes major internal conformational changes upon gating, opening the possibility that the binding site or access to it is altered.

In a typical experiment, we hold the membranes at a potential of -100 mV and the channels in the closed state during the waiting or incubation periods. If the affinity for the initial lipids is indeed lower in the open state, we might be able to prompt their exchange when holding at depolarized potentials. We, thus, held the membrane potential at +80 mV after fusing DOTAP-KvAP proteoliposomes into DPhPC bilayers and determined the conductance voltage relation. Under these conditions, the midpoint of activation was shifted to more hyperpolarized potentials (Fig. 4.4a).

Assuming a symmetric fusion of the vesicles into the bulk bilayer, bilayer and solutions in our system are fully symmetric and should behave identically at symmetric potentials. The difference in the lipid effect at reversed polarity must therefore be caused by the channel proteins, suggesting that either affinity or accessibility of the lipid binding site(s) is increased in the open state.

In spite of the large shift to $V_{1/2} = -16.5$ mV from initially $V_{1/2} = -3.9$ mV ($p < 0.00005$), the effect is somewhat less obvious due to the shallow GVs. However, in comparison, the $V_{1/2}$ shifted by +1.4 mV over a period of 60 minutes when held at -100 mV ($p < 0.1^2$; Fig. 4.4b). Also inward currents only developed after holding the membrane at depolarized potentials (Fig. 4.4c-d). We were not able to reach as low as -40 mV, indicating that the local concentrations did not allow a complete exchange.

² Indicating that the shift when holding at -100 mV is not significant ($p < 0.1$), whereas the shift at +80 mV is ($p < 0.00005$).

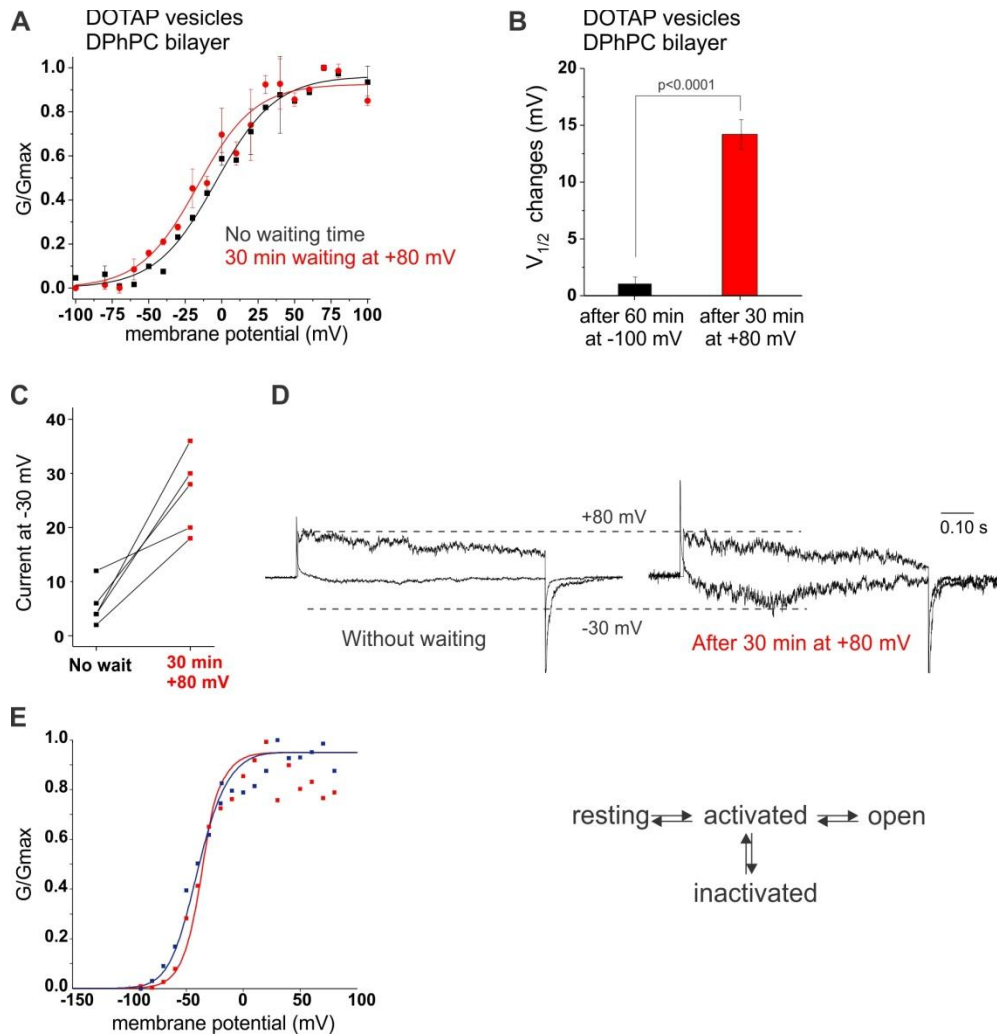


Figure 4.4. State-dependent accessibility of lipid binding site. (A) KvAP reconstituted in DOTAP vesicles were fused to a DPhPC bilayer. Voltage pulses ranging from -100 to +100 mV were applied immediately after fusion (*black*) or after waiting 30 minutes at +80 mV (*red*). Holding at this depolarizing pulse promoted a shift of the midpoint of activation by -12.6 mV. $V_{1/2}$ and V_S values are presented in Table II, $n=5$, error bars are SD. (B) Changes observed in the $V_{1/2}$ values when KvAP channels reconstituted in DOTAP vesicles and fused to a DPhPC bilayer are held 60 minutes at -100 mV (*black*) and 30 minutes at +80 mV (*red*, $p < 0.0001$). (C) Normalized currents at -30 mV for each bilayer experiment show an increase in the open probability after waiting 30 minutes at +80 mV. One example of a current trace is displayed in (D). (E) Kinetic model for the gating behavior of KvAP (27). The transition from the resting to the activated state is the major charge carrying step. In the graph, the GV for KvAP reconstituted in DPhPC vesicles and fused to DPhPC (*red*) and 2:1 DOTAP:DPhPC (*blue*) are shown. The data has been fitted to the kinetic model, where the blue fit has a 2.3-fold lower energy barrier for transitions from the activated to the open and inactivated state.

4.4 Discussion

As integral membrane proteins, voltage-gated ion channels are naturally associated very closely with lipids of the surrounding membrane. It is, therefore, not unexpected that lipids have an influence on the channels' function and modulate their voltage dependence (4-9,11,16-19,24-27). Here, we show that lipids affect Kv channels in two independent pathways that seem to be assigned to a state dependent interaction of lipids "bound" to the voltage sensor domain, shifting the GVs, and an interaction with the lower pore region altering GV steepness.

Although we found a higher affinity for DPhPC than for DOTAP in the initial binding (Fig. 4.3a), bound DOTAP is not easily displaced by DPhPC in the bulk bilayer. Even with KvAP in the open state, no complete exchange was possible. The dissociation rate of the bound lipids, thus, has to be very low. As the binding can be mediated by lipids with such different headgroup characteristics including opposite charges and different steric geometry, the lipids are either indeed trapped at their position or the binding is mediated by the acyl chains, a notion supported by NMR studies of the isolated VSD of KvAP (16).

Decisive for the effect on the conductance-voltage relation seems to be the charge distribution in the headgroups, with cationic headgroups (TAP, ePC) shifting it to depolarized potentials and the anionic headgroup (PS) shifting it to hyperpolarized potentials. Titration with the anionic POPG reversed the effect of the cationic DOTAP. This is consistent with previous findings that the negatively charged PUFAs shift the $V_{1/2}$ to hyperpolarized potentials, as does the cleavage of sphingomyelin by sphingomyelinase D leading to anionic ceramide-phosphate (8-10).

POePC had a more pronounced effect than DOTAP on the voltage dependence of KvAP. They vary slightly in their acyl chains (di-oleoyl versus palmitoyl-oleoyl; Fig. 4.1d), leading to a difference in the bilayer thickness of 1-2 Ångström (28,29). More importantly, the location of the positive charge in the headgroups differs; in POePC, the phosphate group is neutralized by ethylation whereas in DOTAP the entire phosphate group has been removed (Fig. 4.1d). As a consequence, the cationic aminium takes the place of the phosphate group. This changes the location of the positive charge with respect to the arginines in the S4 helix. The location of the

charge in DOTAP mimics the poly-unsaturated fatty acids (PUFAs) in spite of their opposite charge. It would thus destabilize the second gating charge of the S4 in the activated state (25). The charge of POePC is located such that the destabilizing effect of DOTAP is amplified.

We found that the bound lipids, having variable effects on the activation kinetics, seem to anneal to the channel in a state-dependent fashion. Once bound to the channel, we only observed lipid exchange if the channel was in the open state, not as long as it remained in the closed state. The lack of exchange in the closed state raises the question whether experimental design could possibly provoke this effect. We are fusing solvent-free small unilamellar vesicles in painted planar lipid bilayers that contain residues of solvent. It has also been shown that different lipids do not necessarily form a homogenous mixture but develop domains of different thicknesses or phases. It is, however, unlikely that these effects are responsible for the lack of exchange in the closed state. The thickness of the bilayers varies only by 1-2 Å among POPE, DOTAP and DPhPC according to small angle neutron scattering measurements (28,30). Against a physical separation by phase or domain borders between vesicle and bulk lipids also argues that the bulk lipids can come into close vicinity of the channels, as evidenced by the modulation of the GV curves by DOTAP and POPG in the bulk bilayer (Figs. 4.2c and 4.3b). Finally, exchange is possible in a state-dependent manner in a fully symmetric system apart from channel orientation, indicating that not the lipid mixing in the bilayer but the exchange of the bound lipids is inhibited.

As mentioned above, the different lipids had a dual effect on the KvAP channels, both of which were dependent on the electrostatic charge of the headgroups; first the “bound” lipids shifted the GV curves, and second, the “bulk” lipids affected the steepness of the GV curves. The question remains as to what exactly defines “bound lipids”; are those the annular lipids immediately neighboring the channel protein or single lipid molecules linked to a specific binding pocket, as suggested earlier (19,25)? In the crystal structure of the Kv1.2/2.1 chimera, a number of lipids surrounding the channel protein are resolved (2). Although all of them might be tightly bound to the channel, it is unlikely that all of them significantly influence channel gating. It would also be unlikely that all of the annular lipids would change their affinity in a state-dependent manner. A state-dependent “trapping” or affinity change is more feasible for one or a few lipid molecules. The most probable position for such a specific

binding site is the N-terminal S4 near the first gating charges. This region has not only been shown to strongly interact with lipids (12,16), but Börjesson et al. (25) also estimated that, in the Shaker potassium channel, the charge of a PUFA would be 6 Å and 16 Å away from the first gating charge in the open and closed state, respectively. This would place the bound lipid in the cleft between the S4 and the pore domain (Fig. 4.5). This location has also been identified as the sphingomyelin binding site based on competitive interaction with tarantula toxins (26). The state-dependence of this binding site might be due to a general movement of the VSD with respect to the pore domain, trapping the lipids, or internal conformational changes of the VSD leading to different affinities in closed and open state.

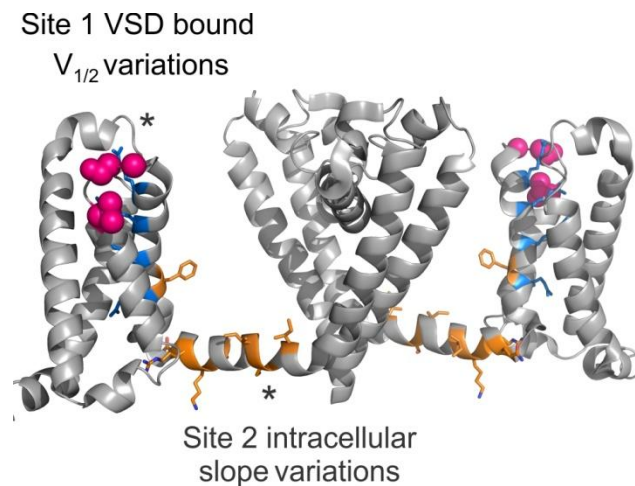


Figure 4.5. Model for lipid binding sites in KvAP. Side view of 2 subunits of the sodium channel NavAb (PDB 4EKW, Payandeh 2012) are shown, with gating arginines colored in blue. For the site responsible for the $V_{1/2}$ variations, we propose a location at the extracellular region of the voltage sensor, possibly at the S3-S4 loop, near the first gating charge. This region (*pink spheres*) has already been shown to strongly interact with lipids, and has also been identified for sphingomyelin based on competitive interaction with spider toxins (8-10,14,16,17,25,26). We propose a second site of interaction at the intracellular side of the channel. The residues in orange correspond to those shown to interact with lipids in the crystal structure of the Kv1.2/2.1 chimera (2). Lipids interacting in this region could affect the energy barriers of pore opening and entry into the inactivated state, possibly by interacting with the S4-S5 linker.

In addition to being shifted, the conductance-voltage relation also displayed a lower slope in the presence of cationic lipids. A lower slope of the GV is typically associated with a reduction in the effective charge z of the voltage sensor movement. However, a reduction in z would lead to a shift to more hyperpolarized potentials, which had to be compensated by the

destabilization of the activated state described above. The fact that the decreased steepness can be prompted by diffusion of DOTAP from the bulk membrane (Fig. 4.2c) suggests that steepness and midpoint are altered independently of one another at two different sites of interaction. Only one of the sites shows state-dependence, and they display different affinity. The fact that DOTAP can influence the GV of KvAP in DPhPC but not vice versa could be caused if the second interaction site has a higher affinity for DOTAP.

As the effect of DOTAP on KvAP in DPhPC is very subtle (Fig. 4.2c), the two effects might also be directly coupled. A lower steepness with a shift of the midpoint of activation to more depolarized potentials can be caused by shifting a second voltage-dependent step to more depolarized potentials (31). This would also act on the region around the cytosolic pore gate and have the same structural implications here but would exclude a direct interaction with the VSD at the outer surface. This possibility is therefore unlikely.

What can we say about the location of the second interaction site? As part of the Kv channel family, KvAP activates by movement of the four VSDs in a voltage dependent manner; once all four S4 are in the activated conformation, concerted (cooperative) movements follow where all VSDs move together, leading to pore opening (32-38). In most Kv channels, pore opening is followed by fast (N-) and slow (C-type) inactivation. While the activation pathway is thought to be identical for KvAP, inactivation has been proposed to be accessible directly from the activated-not open (pre-open) state (Fig. 4.4e; 27). This means that a fraction of the KvAP channels enter the inactivated instead of the open state once activated, similar to Kv4 channels (39). In such a model, the observed lower steepness of the conductance voltage relation without changing the midpoint of activation can be achieved by lowering the energy barriers for both pore opening and inactivation (Fig. 4.4e).

What does this mean structurally? Considering that the channel has to expand to open the lower pore (7), it seems that DOTAP in the lipid matrix facilitates this opening by lowering the energy required for displacing the lipid matrix during a volume change. The strong inactivation that occurs prior to pore opening in KvAP has been proposed to be caused by a weak coupling efficiency between the VSD and pore domain (electromechanical coupling) (27). Electromechanical coupling is mediated by the S4-S5 linker and the C-terminal S6.

During inactivation of KvAP, the link between the S4-S5 linker and the C-terminal S6 would slip (closed state inactivation, reviewed in 39). Thus both pore opening and inactivation occur at the helical bundle crossing and are related to the expansion of this region. DOTAP in the bulk bilayer influences mainly these final transitions of the gating process, whereas the electrostatic charge distribution of the bound lipids influences the gating charge movement.

We can therefore hypothesize that the second interaction site might be found close to the cytosolic pore gate and the region of electromechanical coupling. In figure 5, those residues in the region that have been identified by Long et al. (2) to interact with the surrounding lipids are marked in yellow.

4.5 Conclusions

According to the distinct effects on KvAP gating, we have to distinguish between the lipids bound to specific binding sites and the lipids in the vicinity of the channel. Both influence KvAP gating. The effect of the bound lipids is mediated by the electrostatic charge of the headgroup, suggesting that charged lipid-like compounds offer an important pharmacological tool for the modulation of ion channels as drug targets, for instance, implicating epilepsy, cardiac arrhythmias or ataxia. However, while the electrostatic charge distribution and affinity would allow easy tuning of the channels, the challenge would be to target specific cells or proteins.

The state-dependent affinity to the channel not only has implications for the structural changes during gating but should also be drawn into consideration when investigating protein lipid interactions. In this case, no effect would be observed when cells were held at resting potentials. If such a strong bond prevails also in the open state or for non-voltage-dependent proteins, protein and the bound lipids have to be considered as one macromolecular complex.

4.6 Acknowledgements

We would like to thank Michel Brunette and Mireille Marsolais for technical assistance. Drs. James G. Omichinski and Nazzareno D'Avanzo for helpful discussions. This work was financially supported by the Canadian Institutes for Health Research (MOP-102689), the Natural Sciences and Engineering Research Council (327201-2012) and the Canadian Foundation for Innovation (950-225005). RB holds a Canada Research Chair on the Molecular Mechanisms of Membrane Proteins. EF held a fellowship of the Fonds de recherche du Québec – Nature et technologie (FRQNT). GÉPROM is a research group funded by the Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQS)

4.7 References

1. Long, S. B., Campbell, E. B., and MacKinnon, R. (2005) Crystal Structure of a Mammalian Voltage-Dependent Shaker Family K⁺ Channel. *Science* **309**, 897-903
2. Long, S. B., Tao, X., Campbell, E. B., and MacKinnon, R. (2007) Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment. *Nature* **450**, 376-382
3. Blunck, R., and Batulan, Z. (2012) Mechanism of Electromechanical Coupling in Voltage-Gated Potassium Channels. *Frontiers in pharmacology* **3**, 166
4. Schmidt, D., Jiang, Q. X., and MacKinnon, R. (2006) Phospholipids and the origin of cationic gating charges in voltage sensors. *Nature* **444**, 775-779
5. Borjesson, S. I., Hammarstrom, S., and Elinder, F. (2008) Lipoelectric modification of ion channel voltage gating by polyunsaturated fatty acids. *Biophys J* **95**, 2242-2253
6. 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⁺ channel in transmembrane signaling. *J.Immunol.* **166**, 1009-1015
7. 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
8. Ramu, Y., Xu, Y., and Lu, Z. (2006) Enzymatic activation of voltage-gated potassium channels. *Nature* **442**, 696-699
9. Xu, Y., Ramu, Y., and Lu, Z. (2008) Removal of phospho-head groups of membrane lipids immobilizes voltage sensors of K⁺ channels. *Nature* **451**, 826-829
10. Combs, D. J., Shin, H. G., Xu, Y., Ramu, Y., and Lu, Z. (2013) Tuning voltage-gated channel activity and cellular excitability with a sphingomyelinase. *J Gen Physiol* **142**, 367-380
11. Zheng, H., Liu, W., Anderson, L. Y., and Jiang, Q. X. (2011) Lipid-dependent gating of a voltage-gated potassium channel. *Nature communications* **2**, 250
12. Cuello, L. G., Cortes, D. M., and Perozo, E. (2004) Molecular architecture of the KvAP voltage-dependent K⁺ channel in a lipid bilayer. *Science* **306**, 491-495
13. Freites, J. A., Tobias, D. J., von Heijne, G., and White, S. H. (2005) Interface connections of a transmembrane voltage sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 15059-15064
14. Borjesson, S. I., Parkkari, T., Hammarstrom, S., and Elinder, F. (2010) Electrostatic tuning of cellular excitability. *Biophys J* **98**, 396-403
15. Payandeh, J., Scheuer, T., Zheng, N., and Catterall, W. A. (2011) The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature* **475**, 353-358

16. Krepkiy, D., Gawrisch, K., and Swartz, K. J. (2012) Structural interactions between lipids, water and S1-S4 voltage-sensing domains. *J Mol Biol* **423**, 632-647
17. Krepkiy, D., Mihailescu, M., Freitas, J. A., Schow, E. V., Worcester, D. L., Gawrisch, K., Tobias, D. J., White, S. H., and Swartz, K. J. (2009) Structure and hydration of membranes embedded with voltage-sensing domains. *Nature* **462**, 473-479
18. van der Crujisen, E. A., Nand, D., Weingarth, M., Prokofyev, A., Hornig, S., Cukkemane, A. A., Bonvin, A. M., Becker, S., Hulse, R. E., Perozo, E., Pongs, O., and Baldus, M. (2013) Importance of lipid-pore loop interface for potassium channel structure and function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 13008-13013
19. Weingarth, M., Prokofyev, A., van der Crujisen, E. A., Nand, D., Bonvin, A. M., Pongs, O., and Baldus, M. (2013) Structural determinants of specific lipid binding to potassium channels. *J Am Chem Soc* **135**, 3983-3988
20. 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
21. Gaede, H. C., and Gawrisch, K. (2003) Lateral diffusion rates of lipid, water, and a hydrophobic drug in a multilamellar liposome. *Biophys J* **85**, 1734-1740
22. Zuidam, N. J., and Barenholz, Y. (1997) Electrostatic parameters of cationic liposomes commonly used for gene delivery as determined by 4-heptadecyl-7-hydroxycoumarin. *Biochim Biophys Acta* **1329**, 211-222
23. Jensen, M. O., Jogini, V., Borhani, D. W., Leffler, A. E., Dror, R. O., and Shaw, D. E. (2012) Mechanism of voltage gating in potassium channels. *Science* **336**, 229-233
24. Abbott, G. W. (2006) Molecular mechanisms of cardiac voltage-gated potassium channelopathies. *Curr Pharm Des* **12**, 3631-3644
25. Borjesson, S. I., and Elinder, F. (2011) An electrostatic potassium channel opener targeting the final voltage sensor transition. *J Gen Physiol* **137**, 563-577
26. Milesu, M., Bosmans, F., Lee, S., Alabi, A. A., Kim, J. I., and Swartz, K. J. (2009) Interactions between lipids and voltage sensor paddles detected with tarantula toxins. *Nat Struct Mol Biol* **16**, 1080-1085
27. 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. *J.Mol.Biol.* **390**, 902-912
28. 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. *Biochim Biophys Acta* **1808**, 2761-2771

29. Salvati, A., Ristori, S., Oberdisse, J., Spalla, O., Ricciardi, G., Pietrangeli, D., Giustini, M., and Martini, G. (2007) Small angle scattering and zeta potential of liposomes loaded with octa(carboranyl)porphyrazine. *The journal of physical chemistry. B* **111**, 10357-10364
30. Heberle, F. A., Petruzielo, R. S., Pan, J., Drazba, P., Kucerka, N., Standaert, R. F., Feigenson, G. W., and Katsaras, J. (2013) Bilayer thickness mismatch controls domain size in model membranes. *J Am Chem Soc* **135**, 6853-6859
31. Zagotta, W. N., Hoshi, T., Dittman, J., and Aldrich, R. W. (1994) Shaker potassium channel gating. II: Transitions in the activation pathway. *J.Gen.Physiol* **103**, 279-319
32. Schoppa, N. E., McCormack, K., Tanouye, M. A., and Sigworth, F. J. (1992) The size of gating charge in wild-type and mutant Shaker potassium channels. *Science* **255**, 1712-1715
33. 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. *J.Gen.Physiol* **111**, 313-342
34. Kalstrup, T., and Blunck, R. (2013) Dynamics of internal pore opening in KV channels probed by a fluorescent unnatural amino acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 8272-8277
35. Pathak, M., Kurtz, L., Tombola, F., and Isacoff, E. (2005) The cooperative voltage sensor motion that gates a potassium channel. *J.Gen.Physiol* **125**, 57-69
36. Ledwell, J. L., and Aldrich, R. W. (1999) Mutations in the S4 region isolate the final voltage-dependent cooperative step in potassium channel activation. *J.Gen.Physiol* **113**, 389-414
37. Smith-Maxwell, C. J., Ledwell, J. L., and Aldrich, R. W. (1998) Role of the S4 in cooperativity of voltage-dependent potassium channel activation. *J.Gen.Physiol* **111**, 399-420
38. Bähring, R., and Covarrubias, M. (2011) Mechanisms of closed-state inactivation in voltage-gated ion channels. *The Journal of Physiology* **589**, 461-479
39. Batulan, Z., Haddad, G. A., and Blunck, R. (2010) An intersubunit interaction between S4-S5 linker and S6 is responsible for the slow off-gating component in Shaker K⁺ channels. *J Biol Chem* **285**, 14005-14019

CLOSED-STATE INACTIVATION OF KVAP AND NACHBAC

Elise Faure^{1,2}, Hugo McGuire^{1,3}, Tanja Kalstrup^{1,2}, Rikard Blunck^{1,2,3}

¹Groupe d'étude des protéines membranaires (GÉPROM), Departments of ²Physiology and ³Physics, Université de Montréal, Montréal, Canada

Manuscrit en préparation

Contribution des auteurs:

EF: design expérimental, production des échantillons, acquisition des données en bicouche, analyse des données, interprétation des résultats, écriture de l'article

HM: design expérimental, acquisition des données en bicouche, analyse de données

TK: injection d'ARN et d'ADN dans les ovocytes, acquisition des données en *cut-open*

RB: design expérimental, édition de l'article

Abstract

Inactivation is an essential process for all voltage-gated ion channels and correct propagation of action potentials. Inactivation of KvAP is peculiar in different aspects, and the slow recovery from inactivation forces for long intervals between different pulses in a pulse protocol. In the absence of cytosolic inactivation peptides, inactivation is likely to be caused by the pore domain, through C-type or closed-state inactivation. Closed-state inactivation has been previously suggested for KvAP channels and also for another closely related bacterial channel, NavAb. Here, we investigate inactivation as a function of different parameters such as lipid composition (as KvAP is strongly lipid dependent) and temperature, in comparison with NaChBac. We also study the molecular mechanisms underlying closed-state inactivation by using voltage-clamp fluorometry. We found that entry into inactivation is lipid dependent, but not recovery, and that occupancy of the inactivated state is limited. Also, KvAP does not show a strong temperature dependence in recovery from inactivation suggesting that the underlying mechanism is different between NaChBac and KvAP.

Résumé

L'inactivation est essentielle à la fonction des canaux dépendants du voltage et à la propagation normale des potentiels d'action. L'inactivation du canal KvAP est particulière sous plusieurs aspects, et la récupération très lente de l'inactivation oblige à de longs intervalles entre chaque pulse de dépolarisation. En absence de peptides cytosoliques d'inactivation, celle-ci est probablement causée par le domaine du pore, via l'inactivation de type C ou l'inactivation à partir de l'état fermé. Ce genre d'inactivation a déjà été suggéré pour KvAP, ainsi que pour un autre canal bactérien apparenté, NavAb. Ici, nous avons investigué l'inactivation sous différentes conditions, telles que la composition lipidique (l'activation de KvAP étant fortement lipide-dépendante) et la température, en comparaison avec le canal NaChBac. Nous avons également étudié les mécanismes moléculaires à la base de l'inactivation à partir de l'état fermé par spectroscopie de fluorescence en voltage imposé. Nous avons trouvé que l'entrée dans l'état inactivé est dépendante de la composition des lipides, mais non la récupération et que l'occupation de l'état inactivé est limitée. Aussi, la vitesse de récupération de l'inactivation de KvAP ne montre pas de dépendance à la température, suggérant un mécanisme différent de celui de NaChBac.

5.1 Introduction

Voltage-dependent ion channels play a crucial role in the generation and the propagation of action potentials [1]. Inactivation is an intrinsic characteristic of all voltage-gated ion channels that allows self-regulation, and can be achieved after (N- and C-type inactivation) or before pore opening (closed-state inactivation, CSI) [2]. Although it is thought that KvAP has an activation pathway identical to other eukaryotic Kv channels, inactivation has been proposed to be accessible directly from the closed state [3]. In this case, when the voltage sensors are activated (pre-open state), the channels can directly enter the inactivated state. This type of inactivation has been described for Kv channels ([3-5]), especially the Kv4 family ([6, 7]) and a number of Nav channels ([8-10]). In Kv channels, the molecular basis for CSI is not yet fully understood. It could be coupled to the pore similar to C-type inactivation [11, 12], or it could originate from a lack of coupling between the VSD and the pore domain, through a slippage mechanism between the S4-S5 linker and the C-terminal region of the S6 [3, 5, 13].

The structural basis for CSI in sodium voltage-gated channels has been provided by modelling based on electrophysiological data, where the movement of the voltage sensor domains (VSD) of domain III et IV is not enough to open the channels but sufficient to allow the inactivation particle (the same involved in fast inactivation) to reach its binding site between these two domains and therefore, provoke CSI [9, 14, 15]. Bacterial Nav channels like NaChBac or NavAb lack the linker between the domains III and IV responsible for fast inactivation in eukaryotic channels, but they undergo slow inactivation. KvAP shares high structural homology with NaChBac: they both have much shorter S1-S2 and S3-S4 loops than their eukaryotic homologues and they both lack T1 or C-terminal domains as well as inactivation peptides. Just like NaChBac, KvAP recovers extremely slowly from inactivation [16, 17].

As KvAP lacks the intracellular N-terminal peptide region responsible for N-type inactivation in eukaryotic Kv channels, it does not undergo fast N-type inactivation. In the gating model described by Schmidt *et al* [3], KvAP channels can transition back and forth between the open state and the activated (or pre-open) state, which eventually leads to the inactivated state (sink effect) (Fig.5.1A). This model would account for the entire slow inactivation observed during

a depolarizing pulse. Since KvAP activation has been shown to be very sensitive to its lipid environment [3, 16-19], we first analysed if it was also the case for inactivation. By testing different lipids, we found that inactivation rates varied with lipid types, but that recovery from inactivation was not affected. Testing different time intervals at hyperpolarizing potentials also allowed to establish that the inactivated state is limited to a number of channels and can saturate.

We also investigated if KvAP and NaChBac share the same inactivation mechanisms, with respect to temperature-dependence and structural basis for entry into CSI. It has been reported that recovery from inactivation for NaChBac is highly temperature-sensitive, with a $Q_{10} > 4$ [20]. We therefore tested if it was also the case for KvAP and found that unlike NaChBac, recovery from inactivation of KvAP is not sensitive to temperature.

Molecular basis of closed state inactivation were investigated using voltage-clamp fluorometry in planar bilayer and in oocytes. In the case of NaChBac, we first establish that bacterial Nav undergo CSI. In both channels, we located a position at the bottom of the S4 helix that allowed us to visualize VSD movement during inactivation and correlate it with pore conduction. Insertion of a fluorescent unnatural amino acid (fUAA) allows the incorporation of a small-sized fluorophore at the position of interest, which is especially useful when it is located at the cytoplasmic side of the membrane. It also presents the advantage of the absence of non specific background inherent to labeling. Recently used in cut-open with Shaker to describe the movement of the S4 helix ([21]), here we applied the same technique with NaChBac.

5.2 Methods

5.2.1 Voltage-clamp fluorometry in lipid bilayer

Purification and reconstitution in small unilamellar lipid vesicles of KvAP channels was done according to the experimental procedures published in [16]. In short, KvAP expression is induced in M15 competent cells (*Quiagen*) with 0.5 mM IPTG for 5h at 30°C. Bacterial cells are harvested and lysed by pressure at 15 000 psi with an Emulsiflex-C5 (*Avestin*). Membranes are isolated by ultracentrifugation at 150 000 x g and solubilized with 2% of DM (decyl-maltoside, *Anatrace*). Sample is bound to a cobalt metal affinity column (Talon Superflow, *Clontech*), washed with 10 mM imidazole and eluted with 0.4 M imidazole (*Sigma*). Before labeling with Alexa532 C5-maleimide (*Invitrogen*), sample is reduced with 10 mM TCEP (*Pierce*). After elution, detergent is exchanged for SUVs through dialysis (Slide-A-Lyzer 20 MWCO, *Pierce*).

Planar lipid bilayer recordings were done in 25 mg/mL DPhPC (*Avanti Polar Lipids*) solubilized in decane or in hexadecane. Lipids were painted over an 150-250 µm aperture that partitioned symmetric solutions (150 mM KCl, 10 mM HEPES, pH7.4). Fluorescence was detected with an EMCCD camera (*Andor Technology*). The top of the bilayer was washed several times with internal solution in order to remove the vesicles not fused to the bilayer and, hence, lower fluorescence background. Channels fluorescence intensity was analysed through a tracking program written in house (McGuire and Blunck, in preparation).

5.2.2 Voltage-clamp fluorometry in cut-open configuration

Coding sequence of NaChBac inserted in pBSTA vector was a kind gift from W. Sandtner (Medical University of Vienna). Heterologous expression of wild-type NaChBac in *Xenopus laevis* oocytes was performed according to standard RNA injection procedure, and best expression levels were obtained 7-9 days post-injection at 18°C. Fluorescent unnatural amino acid (fUAA) mutations were inserted and expressed following the protocol described in [21]. The tRNA/AnapRS plasmid and the fUAA Anap [22] were kindly provided by Peter Schultz (Scripps Research Institute). Currents were recorded in cut-open voltage-clamp configuration [23] with internal solution containing 30 mM Na-Mes, 85 mM NMDG, 2 mM

EDTA and 10 mM HEPES and external solution containing 115 mM Na-Mes, 10 mM HEPS, 2 mM $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Both solutions were at pH 7.1. Fluorescence imaging was performed with an EMCCD camera (*Andor Technology*) installed to an upright microscope.

5.3 Results and Discussion

5.3.1 Lipid dependence of the inactivation of KvAP

We have shown previously that KvAP activation was sensitive to its lipid environment [17]. Here we tested whether this holds true for inactivation. We reconstituted KvAP channels in vesicles of different lipid composition (DPhPC, DOTAP, DPhPC: DOTAP 1:1, POPC:POPG 3:1 and POPC) and observed that when KvAP was reconstituted in lipids other than DPhPC, less inactivation was visible during a depolarizing pulse (Fig. 5.1B-E).

Lipid vesicles containing KvAP channels were fused to a planar bilayer to elicit macroscopic currents and entry into inactivation was studied by looking at the current decay during a depolarising pulse at +80 mV. We compared the maximal initial current amplitude with current amplitude remaining after 500 ms for each lipid condition (Fig. 5.1H). Rates of inactivation were also extracted from the current traces and expressed as percentage of current decay per 100 ms (Fig. 5.1I). We chose these units for comparison sake, since time constants could not always be determined with an exponential fit. From these results, we observed that the current elicited from KvAP channels reconstituted in DPhPC decays much faster than in any other lipids (10.5 ± 0.2 % every 100 ms). The strong decay of the current amplitude ($52.7 \pm 0.9\%$, Fig. 5.1h) seems to indicate that in DPhPC channels transition faster between the open and the activated state, leading to the observation of slow inactivation within one pulse. At the contrary, in DOTAP vesicles, a smaller decay is observed (13.1 ± 0.8 %), indicating that not only the rate for entry into the inactivated state is different (2.6 ± 0.2 % every 100 ms, Fig. 5.1I), but also that most of the inactivation occurs at the repolarizing pulse.

To determine whether the headgroup, the acyl chain or the charge carried by the lipids are responsible for affecting entry into inactivation, we tested more lipids. KvAP reconstituted in POPC in the absence and in presence of negatively charged phospholipids (POPG, Fig. 5.1D-G) led to a decay of 24.8 ± 2.5 % and 24.4 ± 1.2 % respectively (Fig. 5.1H). Since both conditions induced a very similar effect on the current amplitude and the rate of inactivation (5.0 ± 0.5 % and 4.9 ± 0.2 % every 100 ms respectively), we were able to eliminate the net negative charge as the cause for the variation in the fraction of channels that inactivate during the depolarizing pulse. Since DPhPC and POPC share the same choline headgroup but lead to

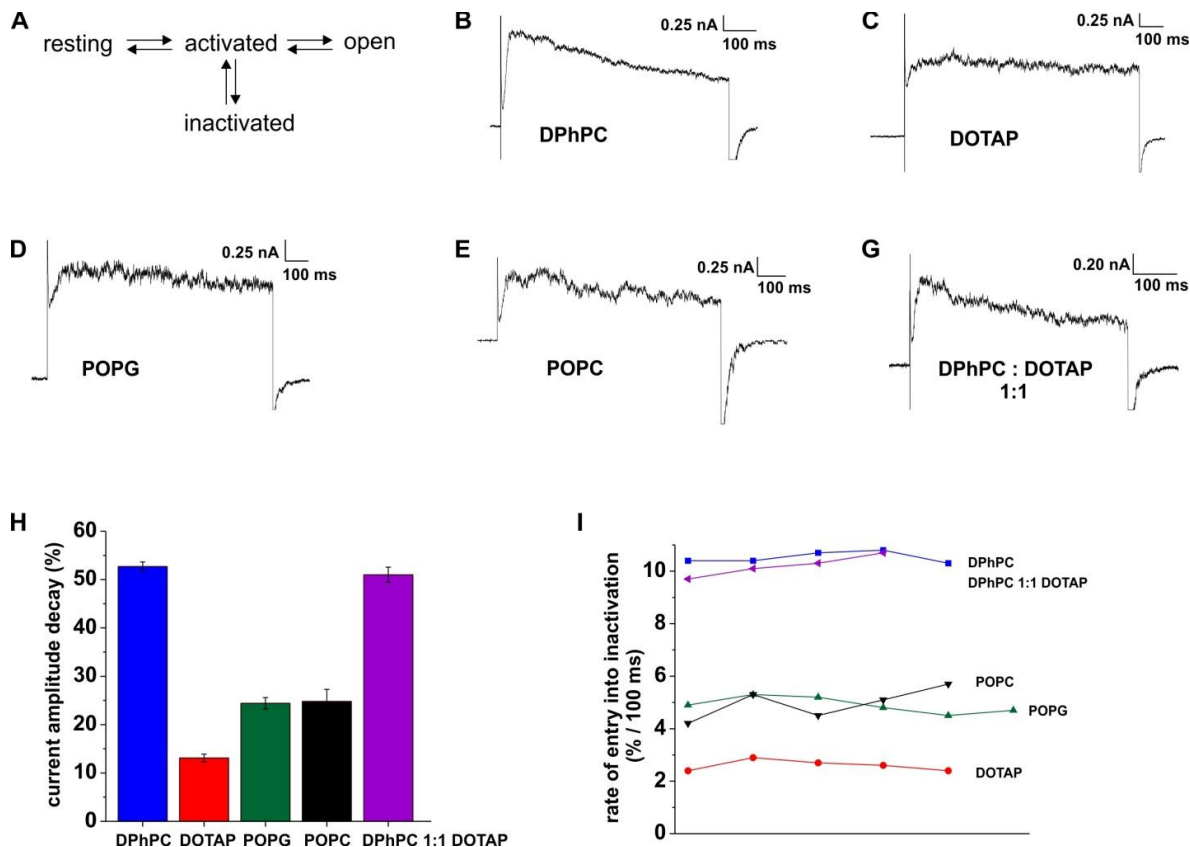


Figure 5.1 KvAP entry into inactivation is lipid-dependent A) KvAP gating model. B-G) Typical current traces of purified KvAP channels reconstituted into vesicles of the indicated composition. H) Current amplitude decay (in percentage) for each lipid condition measured after 500 ms of a depolarising pulse ($n=4-6$, error is S.D.). I) Rates of inactivation during a depolarizing pulse expressed in percentage of lost current per 100 ms for the same lipid conditions. Each dot represents a different bilayer experiment ($n=4-6$).

such different effects (Fig. 5.1H-I), also the headgroup is unlikely to be the primary cause. Thus the peculiar methylated acyl chain of DPhPC seems responsible for the acceleration of the transition between the open and activated (pre-open) state, leading to enhanced inactivation. At the contrary, since POPC and DOTAP share a very similar hydrophobic tail, with one of the acyl chain being identical (a length of 18 carbons with one insaturation degree), the drastic reduction of the inactivation rate is likely to be imputable to the DOTAP positive net charge and/or the lack of a phosphate headgroup.

Interestingly, when KvAP is reconstituted in mixed vesicles of equal amount of DPhPC and DOTAP (Fig. 5.1G) a strong decay occurs (51.0 ± 1.5 %, with a rate of 10.2 ± 0.3 % every

100 ms, Fig. 5.1H-I), indicating a predominant effect of DPhPC on the inactivation. While KvAP channels seem to have a distinct entry into inactivation behavior when reconstituted in pure DPhPC or in pure DOTAP, they seem to have a better affinity for DPhPC in pre-mixed vesicles, as previously reported [17].

When working under these conditions, we found that although entry into inactivation varied among different lipid types, recovery from inactivation remained the same. The time for recovery from inactivation did not change among channels reconstituted into the different lipid compositions. In all cases, equivalent long intervals of 90 seconds between pulses are required, indicating that the recovery from inactivation is not lipid dependent (data not shown).

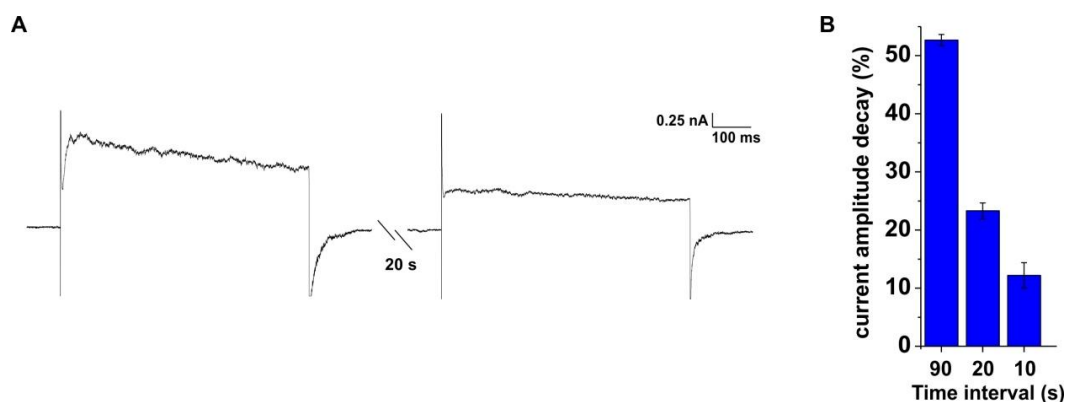


Figure 5.2 KvAP entry into inactivation can saturate A) KvAP channels reconstituted in DPhPC during two depolarizing pulses at + 80 mV. Slow inactivation is reduced when the interval before the second pulse is only 20 seconds. B) Current amplitude decay at 500 ms for different time intervals (n=3-5, error is S.D.).

We observed another DPhPC-related effect on KvAP channels inactivation. Shortening the time interval between the depolarizing pulses resulted in a decrease in the entry into inactivation during the second pulse. (Fig. 5.2A-B). During an interval of 90 seconds, $52.7 \pm 0.9\%$ of channels inactivate during the pulse, but after an interval of 20 seconds, this portion becomes $23.3 \pm 1.4\%$. Entry into inactivation is further reduced with an interval of only 10 seconds between the depolarizing pulses ($12.2 \pm 2.2\%$, Fig. 5.2B). Hence, current traces in figure 5.2A not only exhibit that KvAP channels undergo closed-state inactivation (initial current amplitude of the second pulse is smaller than the end current of the first pulse),

they also reveal that entry into inactivation can saturate, which is not often observed for other types of inactivation.

If 50% of the channels inactivate during the first pulse, and if return to the resting state is very slow, it means that the inactivated state is still partly occupied when a second depolarizing pulse is given. The impossibility for channels during this second pulse to transition back from open (O) to activated (A) to inactivated (I) means that the occupancy of (I) is limited to a number of channels. It could also imply that all channels populate the same (I), reached either through CSI or after pore opening. We have shown that when KvAP is reconstituted in DOTAP vesicles, most of the inactivation occurs during the repolarizing pulse. This also points toward a slow return to the resting state. The fact that in DOTAP the channels inactivate so strongly during the repolarization of the membrane suggests that inactivation might also be triggered from the open state, in a voltage-dependent manner. During closing, the VSD might move and "pull apart" the electromechanical coupling. In a gating model, that would mean that the inactivated state (I) can return to the activated state (A) from the open state (O), but that (A) can also directly enter (I). The gating model presented in figure 5.3 summarizes these observations.

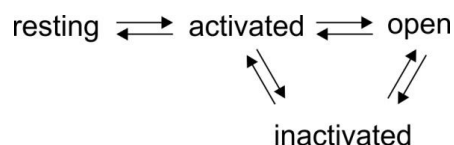


Figure 5.3 KvAP revised gating model. The model is revised based on observations made with KvAP channels reconstituted in DPhPC and in DOTAP.

5.3.2 Temperature dependence of recovery from inactivation

Recovery from inactivation is extremely slow: more than one minute is needed for full recovery. For this reason, all current-voltage relations with KvAP are obtained by waiting for 100 seconds between each pulse. Accordingly, the time for acquiring a complete IV curve becomes rather long. For this reason, we tested if recovery from inactivation could be accelerated by heating the system, as it is the case for the bacterial channel NaChBac. A

heating chamber enabled us to increase the temperature of both internal and external solutions up to 40°C.

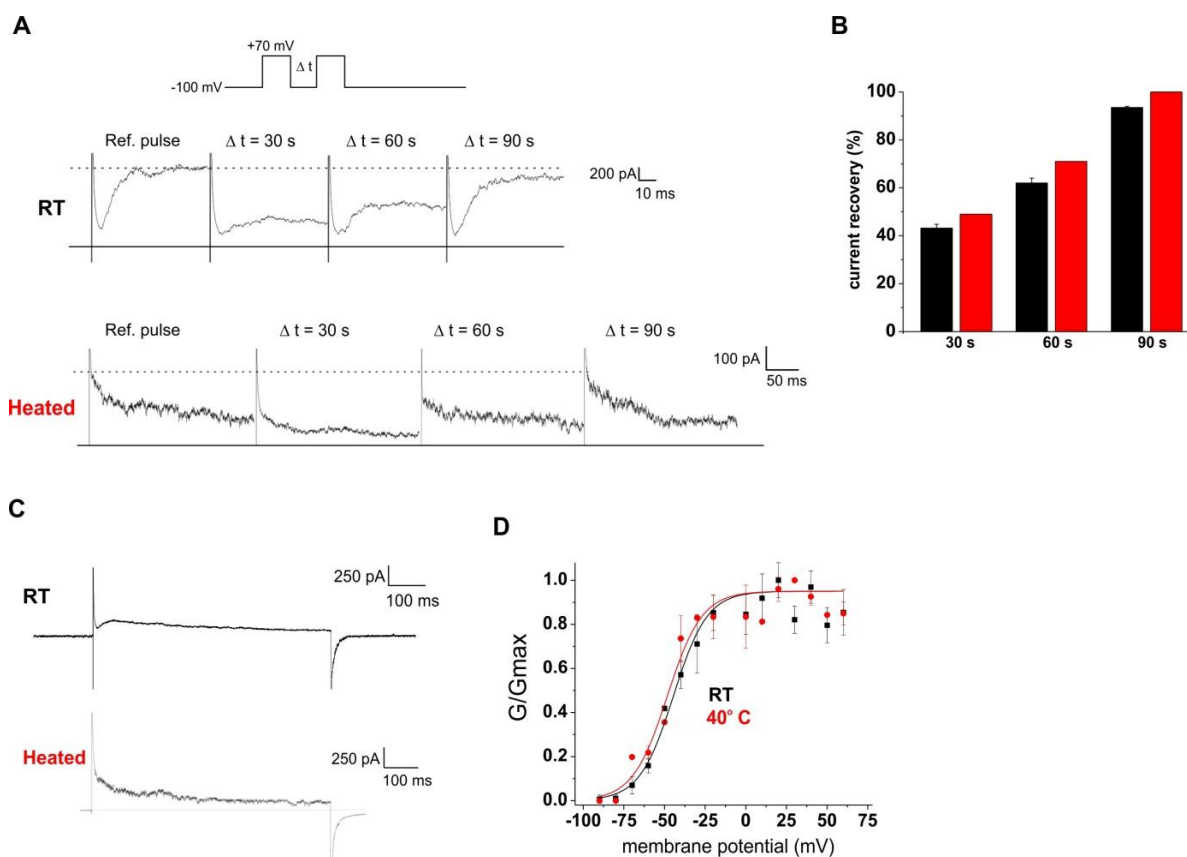


Figure 5.4. KvAP inactivation recovery is not highly temperature dependent. A) Depolarizing pulses were given after varied time intervals at both room temperature (*RT*) and at 35-38°C (*Heated*). Baseline and initial current amplitude are indicated by a full line and a dotted line, respectively. Between each pulse, a waiting period of 100 seconds was given before trying another interval. B) At *RT* (*black columns*), maximum current recovery percentages was 43.2 ± 1.6 % after 30 seconds, 62.0 ± 2.1 % after 60 seconds and 93.5 ± 0.5 % after 90 seconds ($n=2-5$, error is S.D.). At higher temperature (*red*), the current recovery percentage were 49% after 30 seconds, 71% after 60 seconds and 100% after 90 seconds ($n=1$). C) Typical current traces are shown for a depolarizing pulse at +60 mV at *RT* and at 35-38°C. Activation kinetics is faster at higher temperature, which explain the different shapes observed. D) Conductance-voltage relations of KvAP in DPhPC at room temperature (*black*) and at 38-41°C (*red*). Mid-activation points are $V_{1/2} = -43.5 \pm 1.8$ mV ($n=4$) and -47.2 ± 1.5 mV ($n=2$), respectively.

KvAP channels were reconstituted in pure DPhPC vesicles and fused to a bilayer which was then progressively heated up. DPhPC does not have a phase transition below 80°C, but evaporation of the solutions and the resulting uncertainties in concentration become an issue

above 45°C. We compared the initial maximal current amplitude obtained after different time intervals with the reference pulse given within the same bilayer, both at room temperature and at 40°C. At room temperature, 62.0 ± 2.1 % of the initial current amplitude was recovered after a 60 seconds interval at holding potential and 93.5 ± 0.5 % after 90 seconds (Fig. 5.4A). We performed the same pulse protocol at temperatures ranging between 35-38°C. This time, after 60 seconds at holding potential, 71% of initial current was recovered and 100% after 90 seconds (Fig. 5.4A). The data are summarized in the diagram in figure 5.2B. They do not show a drastic change in the rate of recovery from inactivation upon heating, with an overall increase of 10%. The time needed to fully recover from inactivation is still more than one minute at higher temperature, which also indicate a very slow return to the resting state, either from CSI or after pore opening.

Activation was significantly sped up at higher temperatures ($Q_{10} > 2$). At +70 mV, the time constant of activation at room temperature is 6.0 ± 1.1 ms ($n=6$), which allows observing the sigmoidal development of the current. Bilayer measurements at higher temperatures were performed with less current in order to improve the bilayer stability. While this affected the quality of the data, we were still able to determine that the time constant accelerated from 6.0 ± 1.1 ms to 3.2 ± 2.5 ms ($n=4$) (Fig. 5.4C). Faster activation kinetics did not affect the voltage-dependence of the open probability. Figure 5.4D shows that there is no significant shift of the mid-activation point ($V_{1/2}$) of the conductance-voltage relation at increased temperature.

For comparison, we expressed NaChBac in oocytes and carried out measurements at room temperature, at 30-35°C and 35-40°C (Fig. 5.5). Like KvAP, recovery from inactivation of NaChBac is very slow. Although activation and inactivation kinetics are slower for NaChBac than for eukaryotic sodium channels, all components were accelerated by increase in temperature, as expected (Fig. 5.5A), and peak inward currents were achieved faster by 125 ms. Peak current-voltage relation exhibits a maximum inward amplitude at -30 mV (Fig. 5.5B) and the mid-activation point of the voltage dependence is -37.6 mV (Fig. 5.5C). Both peak current and voltage-dependent activation were not affected by an increase in temperature to 40°C. In oocytes, although the recovery from inactivation seem slower than

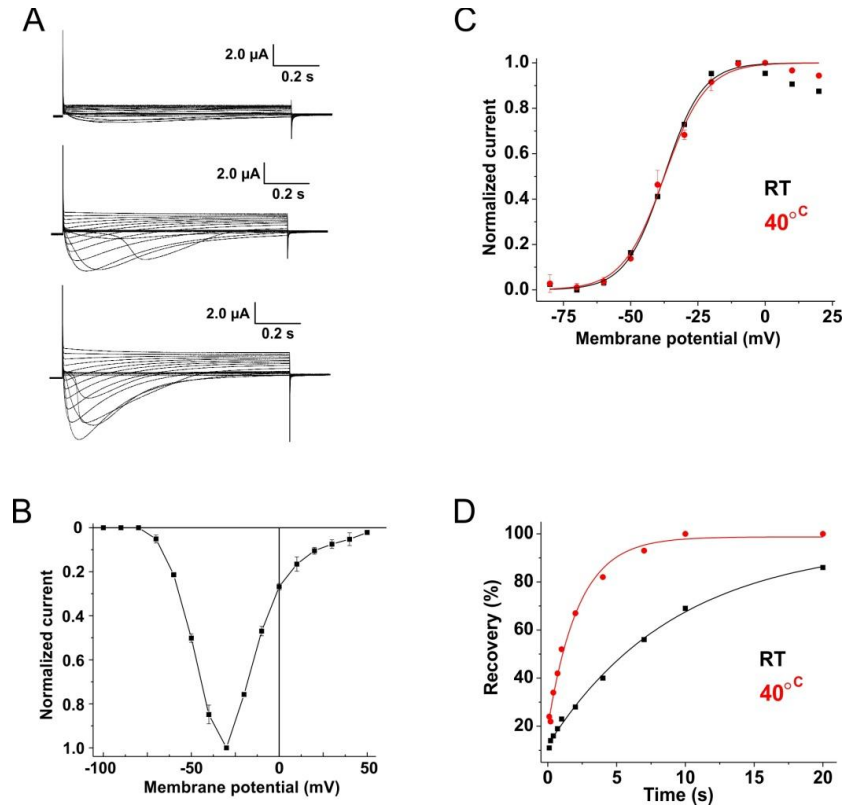


Figure 5.5. NaChBac expressed in *Xenopus laevis* oocytes is temperature sensitive. A) NaChBac currents in oocytes at different temperatures: room temperature (*top*), 30°C (*middle*) and 35-40°C (*bottom*). Currents were elicited by depolarizing pulses of 1 second ranging from -100 to +50 mV. Holding potential was -120 mV. B) Normalized peak current-voltage relation for NaChBac for all temperatures. Peak current is obtained at -30 mV ($n = 10$, error is S.D.). C) Normalized activation curves obtained from tail currents at -30 mV at room temperature (*black*) and 40°C (*red*). The mid-activation values are $V_{1/2} = -37.6$ mV and -37.4 ± 0.6 mV respectively. D) Recovery from inactivation between pulses at -30 mV with varying inter-pulses intervals (100 ms to 20 seconds) at room temperature (*black*) and 40°C (*red*). Holding potential was -120 mV and channels were allowed to recover for 30 seconds between each set of pulses. Amplitude of peak current was recovered at 90% after 20 seconds at room temperature while at 40°C, 93% was recovered after 7 seconds and 100% after 10 seconds.

previously reported in COS cells [20, 24], it remains temperature dependent ($Q_{10} > 2$). At room temperature, after 20 seconds, 85% of the channels had recovered from inactivation while at 35°C they fully recovered after 10 seconds (Fig. 5.5D). In that regard, NaChBac is different than KvAP. Molecular determinants for temperature sensitivity are not known, but the lack of broad temperature-related effects on KvAP could be related to the original bacteria

it comes from. *Aeropyrum pernix* is a strictly aerobic hyperthermophilic species with an optimum growth achieved between 90-95°C [25].

5.3.3 Closed-state inactivation in KvAP

Closed-state inactivation (CSI) was observed in KvAP (Fig 5.2A). While detailed mechanistic information is available for inactivation types occurring after pore opening, much less is known about the molecular basis of CSI. It is proposed that a slippage between the S4-S5 linker and the S6 C-terminal region could be the structural cause for this phenomenon [2, 3]. In that case, the voltage sensor domain could adopt a specific conformation related to CSI. We produced a homology model of KvAP in both closed and open states based on a previous Shaker model [26] and selected a residue which the side chain orientation seemed to change drastically during gating. We then constructed cysteine mutants along the S4 helix and the S4-S5 linker and labeled them with the fluorophore Alexa532 at positions susceptible to undergo fluorescence quenching. Position S132 at the bottom of S4 was studied in more detail.

S132C induced a rightward shift in the voltage-dependent activation ($V_{1/2} = +8.6 \pm 1.5$ mV) and also decreased the slope of the GV curve ($V_S = 22.0 \pm 1.4$ mV, Fig. 5.6A). A single exponential fit to the current traces led to time constants for activation and inactivation of 6.7 ± 0.2 ms and 143.5 ± 0.9 ms respectively (Fig. 5.6B). Fluorescence signal of S132C changed with a time constant that seemed to correlate with inactivation. When recording simultaneously the fluorescence change upon depolarization, we observed that the decay of the quenching correlated with the inactivation time course (Fig. 5.6C). Since S132 is located at the cytosolic end of the S4 helix, it might not be directly involved in the development of the CSI, but might reflect the voltage sensor movement during the putative slipping of the electromechanical coupling between the S4-S5 linker and the C-terminal S6. According to its relation to inactivation, the lower S4 did not return immediately upon deactivation to the resting state position but took longer. This is consistent with the slow recovery from inactivation observed in KvAP.

While other positions at the end of the S4-S5 linker, where residues have been previously reported to participate in the dynamic coupling responsible for CSI in Kv4 channels [5], should yield novel information on the CSI in KvAP, we did not succeed in obtaining

sufficiently large fluorescence changes from other positions we tested. A negative response, however, does not automatically mean that no conformational changes occur at the tested positions. It could also be that the conformational change does not lead to a change of environment of the attached fluorophore.

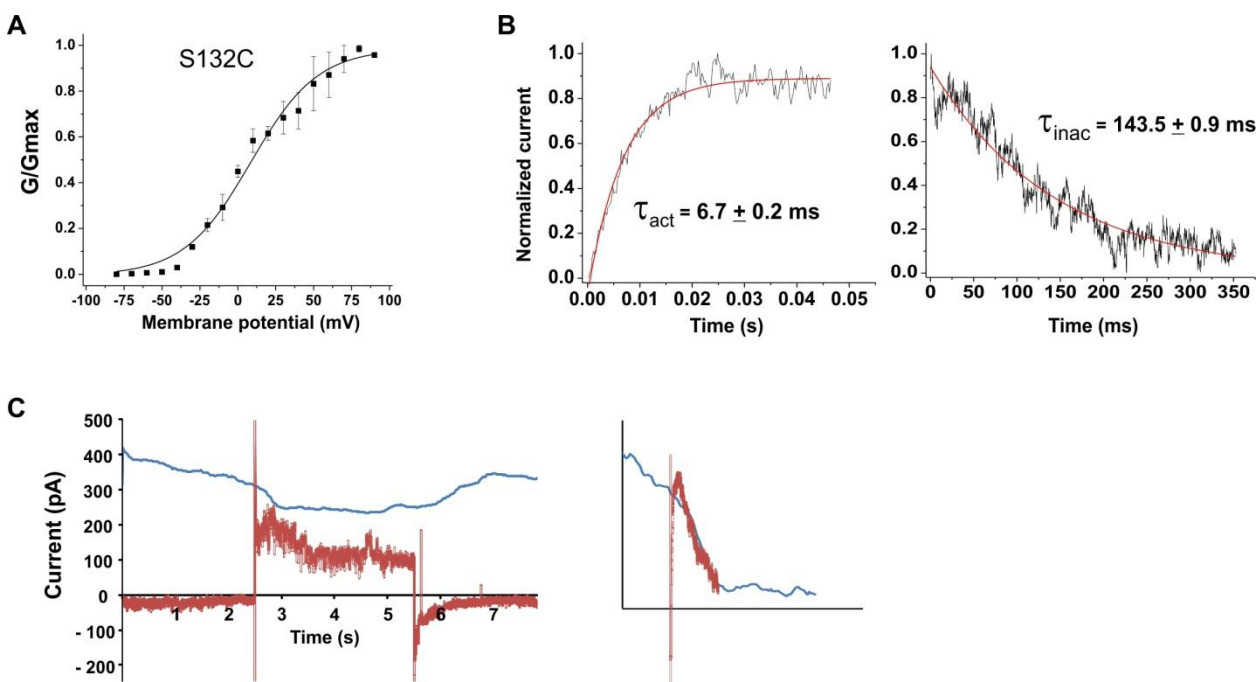


Figure 5.6. Closed-state inactivation with KvAP in bilayer. A) Conductance-voltage relation for KvAP mutant S132C in DPhPC. The mid-activation point is $V_{1/2} = +8.6 \pm 1.5$ mV and the slope steepness is $V_S = 22.0 \pm 1.4$ mV ($n=4$, error is S.D.). B) Time constants of activation (*left*) and inactivation (*right*) for KvAP S132C at a +100 mV depolarizing pulse and a -100 mV holding potential. Each current trace was fitted individually with a single exponential and the determined tau were then averaged. Error is S.D. for $n=4$ D) Voltage-clamp fluorometry in bilayer. Fluorescence emitted from the channels in the bilayer was detected with an EMCCD camera during a voltage protocol. Overlap of the fluorescence signal (blue) with the current trace (red) follows slow inactivation.

In order to improve the data acquisition, we used a different expression system. Heterologous expression in oocytes can yield high expression levels and would thus facilitate fluorescence signal detection and analysis, without the technical difficulties inherent to bilayers such as membrane stability and vesicle background. KvAP coding sequence was sub-cloned into the

pBSTA vector. Unfortunately, KvAP DNA and RNA failed to express in oocytes. It was suggested earlier that the high content of cholesterol found in eukaryotic cells inhibit KvAP activity, and cholesterol has been shown to inhibit KvAP activity when added to vesicles [19]. We wondered if the channels were trafficked to the membrane but remained silent. To test this hypothesis, we treated the oocytes with 10 mM methyl-cyclodextrin (M β CD) for 30 minutes before the experiments. Although oocytes survival was not affected, no current could be detected other than endogenous currents, which proved larger.

5.3.4 Closed-state inactivation in NaChBac

We tested whether in NaChBac the lower S4 also rearranges during inactivation. We took advantage of our laboratory expertise in cut-open voltage-clamp technique combined to genetically-encoded fluorescent unnatural amino acids (fUAA) to investigate closed-state inactivation. NaChBac, unlike its eukaryotic counterparts, is a homotetramer formed by identical monomers and lacks the inactivation particle. Therefore, like KvAP, it can only undergo slow inactivation, related to the pore region [27].

NaChBac inactivation time constant at -10 mV has been reported to be 166 ms in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells, which is about 10 times slower than eukaryotic Nav [28] and favors spectroscopic detection. Since small depolarizing pulses promote the partially activated closed state, which in turn promotes entry into CSI, this type of inactivation has been known to be more prominent for small depolarisations. Here, from holding potential at -120 mV, we did pre-pulses to -70 mV of increasing durations and then pulsed to -30 mV. As the channels stayed longer in the pre-open state, a more important fraction of channels entered directly the inactivated state (Fig. 5.7A). This way, we were able to confirm presence of CSI and determine the fraction that inactivates during the pre-pulse. Based on sequence alignment, we found that the residue S129 in NaChBac is the equivalent position S132 in KvAP. Interestingly, this mutation had the same rightward shift effect, and the peak inward current was displaced from -30 to -10mV (Fig. 5.7B).

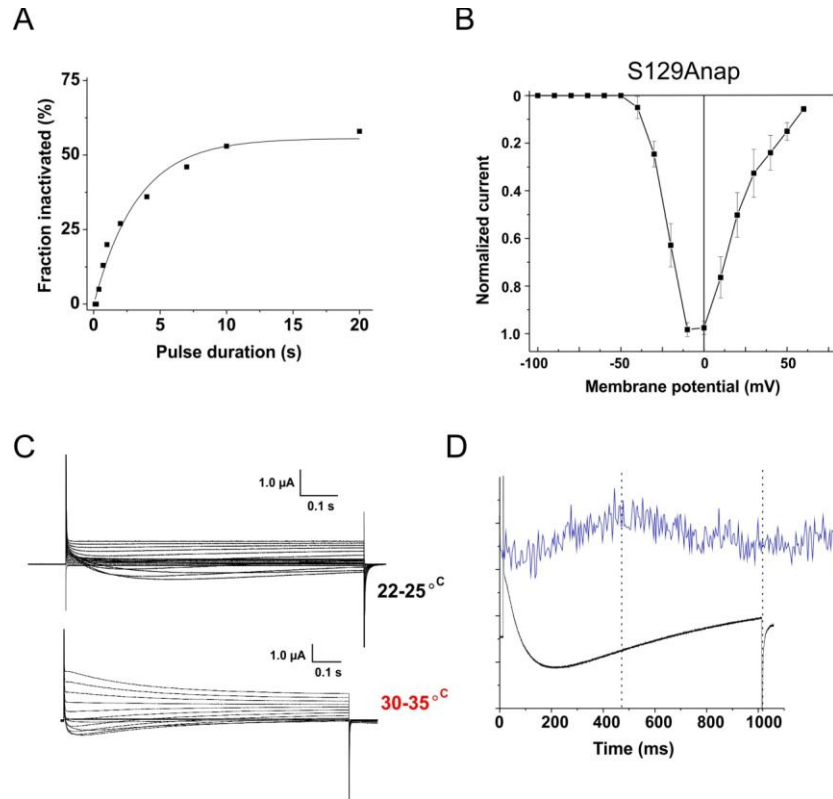


Figure 5.7. Closed-state inactivation with NaChBac in oocytes. A) Fraction of channels that inactivate directly from the pre-open state. From an holding potential of -120 mV, a pre-pulse at -70 mV of a variable duration was applied and then stepped to -30 mV. B) Normalized peak current-voltage relation for NaChBac mutant S129Anap. Peak current was obtained at -10 mV, $n = 6$. C) NaChBac S129Anap currents at different temperatures. Currents were elicited by depolarising pulses of 800 ms ranging from -100 to +50 mV with holding potential at -120 mV. D) Example of a fluorescence signal for S129Anap during a pulse from -120 to -10 mV with a frame rate of 4 ms.

Expression yield was already limited with NaChBac wild-type in oocytes, and the introduced codon stop mutation reduced it by half. Figure 5.7C shows typical current traces elicited at room temperature and at 30-35°C. Like in wild type channels, current amplitude is increased at higher temperature and the kinetics of activation and inactivation are accelerated. To overcome the low level of expression, we monitored the fluorescence with an EMCCD camera. But with only 0.5 to 1.5 μ A of current at -10 mV, no satisfying fluorescence changes upon depolarization could be detected (Fig. 5.7D). Whether it is due to the size of the signal or to the lack of quenching at this position remains to be clarified. Voltage-dependent activation rearrangements on top of the S3-S4 linker of NaChBac has already been described in patch-

clamp fluorometry [29], and the next step is to incorporate fUAA in CHO or HEK cells in order to increase expression and hence, the fluorescence signal.

5.4 Conclusions

The coupling mechanism between the activation of the VSD and the inactivation of the pore is not fully elucidated. We found that inactivation seems to be related to conformational changes at the lower S4. This would be consistent with the model of CSI slipping mechanism as suggested for Kv4 and NavAb, but also with movements of the VSD during C-type inactivation in Shaker [21, 30]. The precise role of this region remains to be determined.

We have investigated KvAP inactivation under different conditions and found that although recovery from inactivation proved insensitive to lipid composition and temperature, inactivation itself is lipid dependent. We suggested earlier the possibility that DOTAP influences the last transition before pore opening by facilitating both of its directions (open and inactivated), resulting in a decreased steepness of the GV curves [17]. Here we suggest that DPhPC also influences this transition by accelerating the rate between the open and activated state as an explanation for the strong current decay within one depolarizing pulse. Also in DPhPC, the fact that less inactivation is observed when the intervals are shorten suggests that a limited number of channels can enter (I). Both in DPhPC and in DOTAP, a delayed return to the resting state seem to be the cause for the slow recovery from inactivation. This could be related to the fact that in KvAP channels, the VSD seemed to transition back to its down state after pore closing.

5.5 Acknowledgements

We want to thank Mireille Marsolais and Michel Brunette for technical assistance and Dr Walter Sandtner for kindly providing the plasmid of NaChBac.

5.6 References

1. Hodgkin, A.L. and A.F. Huxley, *A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve*. J Physiol, 1952. **117**(4): p. 500-44.
2. Bähring, R. and M. Covarrubias, *Mechanisms of closed-state inactivation in voltage-gated ion channels*. J Physiol, 2011. **589**(Pt 3): p. 461-79.
3. Schmidt, D., S.R. Cross, and R. MacKinnon, *A gating model for the archeal voltage-dependent K(+) channel KvAP in DPhPC and POPE:POPG decane lipid bilayers*. J Mol Biol, 2009. **390**(5): p. 902-12.
4. Aldrich, R.W., *Inactivation of voltage-gated delayed potassium current in molluscan neurons. A kinetic model*. Biophys J, 1981. **36**(3): p. 519-32.
5. Barghaan, J. and R. Bähring, *Dynamic coupling of voltage sensor and gate involved in closed-state inactivation of kv4.2 channels*. J Gen Physiol, 2009. **133**(2): p. 205-24.
6. Jerng, H.H., P.J. Pfaffinger, and M. Covarrubias, *Molecular physiology and modulation of somatodendritic A-type potassium channels*. Mol Cell Neurosci, 2004. **27**(4): p. 343-69.
7. Bähring, R., et al., *Kinetic analysis of open- and closed-state inactivation transitions in human Kv4.2 A-type potassium channels*. J Physiol, 2001. **535**(Pt 1): p. 65-81.
8. Aldrich, R.W., Jr., P.A. Getting, and S.H. Thompson, *Inactivation of delayed outward current in molluscan neurone somata*. J Physiol, 1979. **291**: p. 507-30.
9. Armstrong, C.M., *Na channel inactivation from open and closed states*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(47): p. 17991-6.
10. Cummins, T.R., et al., *Nav1.3 sodium channels: rapid repriming and slow closed-state inactivation display quantitative differences after expression in a mammalian cell line and in spinal sensory neurons*. J Neurosci, 2001. **21**(16): p. 5952-61.
11. Loots, E. and E.Y. Isacoff, *Protein rearrangements underlying slow inactivation of the Shaker K+ channel*. J Gen Physiol, 1998. **112**(4): p. 377-89.
12. Olcese, R., et al., *Correlation between charge movement and ionic current during slow inactivation in Shaker K+ channels*. J Gen Physiol, 1997. **110**(5): p. 579-89.
13. Shin, K.S., et al., *Inactivation in HCN channels results from reclosure of the activation gate: desensitization to voltage*. Neuron, 2004. **41**(5): p. 737-44.
14. Patlak, J., *Molecular kinetics of voltage-dependent Na+ channels*. Physiol Rev, 1991. **71**(4): p. 1047-80.
15. Horn, R., S. Ding, and H.J. Gruber, *Immobilizing the moving parts of voltage-gated ion channels*. J Gen Physiol, 2000. **116**(3): p. 461-76.
16. Faure, E., et al., *A limited 4 a radial displacement of the s4-s5 linker is sufficient for internal gate closing in kv channels*. J Biol Chem, 2012. **287**(47): p. 40091-8.
17. Faure, E., C. Thompson, and R. Blunck, *Do lipids show state-dependent affinity to the voltage-gated potassium channel KvAP?* J Biol Chem, 2014.
18. Schmidt, D., Q.X. Jiang, and R. MacKinnon, *Phospholipids and the origin of cationic gating charges in voltage sensors*. Nature, 2006. **444**(7120): p. 775-9.
19. Zheng, H., et al., *Lipid-dependent gating of a voltage-gated potassium channel*. Nat Commun, 2011. **2**: p. 250.
20. Correa, A.M., *Temperature-Dependence of Gating of the Bacterial Sodium Channel, NaChBac*. Anesthesiology, 2003. **99**: p. A806.
21. Kalstrup, T. and R. Blunck, *Dynamics of internal pore opening in K(V) channels probed by a fluorescent unnatural amino acid*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(20): p. 8272-7.

22. Lee, H.S., et al., *Genetic incorporation of a small, environmentally sensitive, fluorescent probe into proteins in Saccharomyces cerevisiae*. J Am Chem Soc, 2009. **131**(36): p. 12921-3.
23. Stefani, E. and F. Bezanilla, *Cut-open oocyte voltage-clamp technique*. Methods Enzymol, 1998. **293**: p. 300-18.
24. Kuzmenkin, A., F. Bezanilla, and A.M. Correa, *Gating of the bacterial sodium channel, NaChBac: voltage-dependent charge movement and gating currents*. J Gen Physiol, 2004. **124**(4): p. 349-56.
25. Tiwari, J.K. and S.K. Sikdar, *Temperature-dependent conformational changes in a voltage-gated potassium channel*. Eur Biophys J, 1999. **28**(4): p. 338-45.
26. Chanda, B., et al., *Gating charge displacement in voltage-gated ion channels involves limited transmembrane movement*. Nature, 2005. **436**(7052): p. 852-6.
27. Pavlov, E., et al., *The pore, not cytoplasmic domains, underlies inactivation in a prokaryotic sodium channel*. Biophys J, 2005. **89**(1): p. 232-42.
28. Ren, D., et al., *A prokaryotic voltage-gated sodium channel*. Science, 2001. **294**(5550): p. 2372-5.
29. Blunck, R., et al., *Detecting rearrangements of shaker and NaChBac in real-time with fluorescence spectroscopy in patch-clamped mammalian cells*. Biophys J, 2004. **86**(6): p. 3966-80.
30. Haddad, G.A. and R. Blunck, *Mode shift of the voltage sensors in Shaker K⁺ channels is caused by energetic coupling to the pore domain*. J Gen Physiol, 2011. **137**(5): p. 455-72.

CONCLUSIONS

Les travaux de recherche menés dans le cadre de cette thèse de doctorat portait sur la relation structure - fonction des canaux ioniques dépendants du voltage et sélectifs au potassium. Plus précisément, le canal modèle bactérien KvAP a servi à investiguer le couplage électromécanique et l'influence de l'environnement lipidique sur son activité. Ces travaux ont permis de reconstituer le mouvement du linker S4-S5 durant le gating et de produire un modèle dans l'état fermé à partir de ces nouvelles contraintes expérimentales du côté cytosolique. Ce modèle révèle qu'un très léger déplacement latéral du linker S4-S5 est suffisant pour induire la fermeture du pore au niveau de la *gate* d'activation, qui n'effectue qu'un léger mouvement de 3-4 Å.

D'autre part, la reconstitution de KvAP en vésicules et en bicouches dont la composition en lipides pouvait être variée et contrôlée a mis en évidence deux sites d'interactions entre les lipides et KvAP, menant à deux effets distincts sur l'activation. Un premier, du côté extracellulaire du VSD, affecte l'équilibre fermé/ouvert du canal, probablement par effets électrostatiques. Un second, du côté intracellulaire, possiblement à proximité du linker S4-S5, influence la barrière énergétique requise pour entrer dans les états ouvert et inactivé à partir de l'état activé "pré-ouvert". La même stratégie de reconstitution a démontré que l'entrée dans l'état inactivé de KvAP est également sensible à la composition lipidique, où les dernières transitions du modèle de *gating* semblent affectées. Nous avons constaté que contrairement aux processus d'activation et d'inactivation, le temps de récupération de l'inactivation de KvAP est insensible aux variations de température et de lipides, probablement en raison d'un retour à l'état au repos extrêmement lent.

Enfin, les bases structurales responsables du *closed-state inactivation* ont été étudiées par spectroscopie de fluorescence en voltage imposé pour les canaux bactériens KvAP (en bicouche) et NaChBac (en ovocytes avec la technique du *cut-open*). Malgré les limitations expérimentales rencontrées, nous avons identifié la région C-terminale de l'hélice S4 comme région d'intérêt à investiguer davantage.

Malgré la pénurie de structures 3D à haute résolution dans l'état fermé au repos des Kv, il est maintenant largement accepté que les réarrangements conformationnels internes du VSD liés à l'ouverture du pore sont modestes, avec un glissement de l'hélice S4 d'environ 6-10 Å combiné à des mouvements légers d'inclinaison (*tilt*) et de rotation. Le modèle que nous avons produit dans l'état fermé va dans ce sens. Cependant, une des limitations rencontrée lors de la reconstitution du mouvement des linkers S4-S5 est l'incapacité de distinguer les mouvements symétriques des quatre linkers par rapport au pore: de bas en haut ou de gauche à droite. Ainsi, malgré plusieurs modélisations réalistes, le déplacement global du VSD par rapport au pore est moins connu. Est-il à la même échelle que les réarrangements internes, donc plutôt réduit, ou est-il plus important et voit-on les VSD s'écarter du pore? Des mouvements de rotation et de translation du VSD par rapport au pore ont été suggérés suite à une simulation de dynamique moléculaire tout atomes [127] et à la cristallisation d'un canal sodique [77] mais ne font pas l'unanimité. La création de plus ou moins d'espace entre le VSD et le pore (poches ou cavités) en fonction de l'état conformationnel du canal pourrait expliquer les variations d'affinité ou d'accessibilité pour les lipides que nous avons observées chez KvAP. En effet, l'échange de lipides ne semblait possible que lorsque le canal était maintenu dans l'état ouvert.

Nous avons effectivement constaté que l'échange de lipides est extrêmement limité autour de KvAP, évoquant la possibilité de sites de liaison ou de poches d'affinité. Le périmètre des canaux Kv est irrégulier et contient plusieurs cavités hydrophobes. Les lipides y sont arrangés différemment que dans le reste de la membrane, soumis à la contrainte de combler ces espaces. De fait, plusieurs structures cristallines contiennent des chaînes acyles résolues occupant ces cavités, et dont la vitesse d'échange pourrait être affectée. Des simulations de dynamique moléculaire (MD) montrent que la mobilité latérale des lipides est bien ralentie à proximité immédiate des VSD, et des grappes de lipides à déplacement lent sont également observées et semblent correspondre à des motifs de sites de liaison à la surface des protéines [49]. Des interactions non liantes favorables entre le VSD et les lipides pourraient expliquer cette perte de mobilité.

Les canaux ioniques dépendants du voltage possèdent des préférences en matière de lipides, en particuliers pour les phospholipides chargés négativement tels que le POPG [158, 159]. Selon

des simulations MD, le VSD formerait des interactions préférentielles avec les lipides anioniques d'une durée de vie de l'ordre de la microseconde, équivalent à une interaction "semi-spécifique" [152, 154]. L'examen de pores seuls en absence de VSD réduit dramatiquement la spécificité lipidique, suggérant que celle-ci provient bien d'interactions avec le VSD [159]. Ceci correspond à nos observations où KvAP affiche une préférence pour le DPhPC lorsqu'exposé simultanément avec le DOTAP, ainsi qu'une préférence nette pour le POPG. La membrane de l'organisme dont provient KvAP (et en général des bactéries dont sont issus les canaux étudiés) étant composée principalement de phospholipides anioniques, dont le POPG, cette préférence peut s'expliquer par évolution et adaptation naturelle et refléter l'optimisation de la structure de la protéine en présence d'un environnement lipidique spécifique. Ainsi, le comportement d'un même canal change drastiquement d'un type cellulaire à un autre, mais la protéine elle-même demeure intacte, ayant une haute tolérance structurale à tout changement de composition lipidique [235]. La question de l'affinité pourrait se résumer en disant que la fonction d'un canal est optimale en présence d'un certain lipide, mais que ce n'est pas un pré-requis à sa fonction. Ceci pourrait expliquer que la fonction de KvAP est préservée même en présence majoritaire d'un non phospholipide chargé positivement tel que le DOTAP.

En effet, contrairement à ce qui a été rapporté précédemment ([138]), nous avons pu constater que KvAP demeure fonctionnel en absence de phospholipides: les canaux reconstitués en vésicules formées exclusivement de DOTAP et fusionnés à une bicouche composée elle aussi uniquement de DOTAP ont généré des courants macroscopiques. Le manque de stabilité lié à une bicouche de DOTAP fournit peut-être une explication aux résultats négatifs publiés antérieurement. La possibilité que certains lipides endogènes soient toujours présents au cours de la solubilisation des membranes et durant le processus de purification et qu'ainsi la condition de DOTAP ne soit pas parfaite est également à prendre en considération. Cette divergence dans les résultats ne peut pas être comparée avec d'autres sources de données. De nombreux résultats ont été obtenus à l'aide de fragments d'anticorps et de toxines se liant à une conformation spécifique du VSD de KvAP reconstitué en vésicules, mais il existe très peu de données d'électrophysiologie avec ce canal. Des simulations de courbes conductance-voltage sont plutôt utilisées [140, 157].

Nous savons maintenant que le DOTAP favorise la conformation au repos (ou relaxée/inactivée) de KvAP. Des observations par RMN ont démontré que la présence de DOTAP (et l'absence de phospholipides) n'affectait pas de façon majeure la structure du VSD isolé de KvAP [152, 153]. Cette observation est en concordance avec les réarrangements modestes observés en LRET. Les auteurs suggèrent que la dernière étape concertée de l'activation des VSD, menant à l'ouverture du pore et impliquant un mouvement réduit de S4 [236], serait sensible au remplacement d'un phospholipide par le DOTAP. Ceci est en accord avec le modèle cinétique que nous proposons, où les effets du DOTAP sur la pente de la courbe d'activation voltage-dépendante s'explique par un abaissement de la barrière énergétique pour les dernières transitions entre l'état activé pré-ouvert et l'ouverture du pore et l'inactivation. La composition en lipides de la membrane influence plusieurs transitions dans le gating de KvAP [217]. Comprendre comment différentes composantes des lipides (tête polaire, glycérol, liens esters et éthers, degrés de saturation et structure de la queue) affecte ces transitions demeure un défi.

L'effet majeur sur l'activation de KvAP induit par le DOTAP est le déplacement du potentiel de mi-activation vers des voltages plus dépolarisants. Ici, nous avons plutôt suggéré un effet électrostatique, basé sur les résultats de neutralisation des effets du DOTAP par l'ajout de charges négatives (POPG). Plusieurs observations antérieures d'effets électrostatiques ont été rapportées: les acides gras polyinsaturés (PUFAs) influencent l'ouverture du canal Kv Shaker en déplaçant sa courbe de dépendance au voltage en fonction de la charge nette qu'ils portent [141-143]. Le site d'action de tels effets se localise dans la région extracellulaire du VSD, et affecterait directement les arginines de l'hélice S4. Un tel mécanisme n'est pas anodin et peut avoir des répercussions pour des pathologies où l'excitabilité cellulaire est perturbée.

En effet, les substances lipophiliques chargées peuvent moduler l'ouverture des canaux et en conséquence, l'excitabilité, par un mécanisme d'interaction électrostatique avec les VSD [143]. De tels composés auraient des effets bénéfiques contre l'hyperexcitabilité impliquée dans des conditions telles que l'arythmie cardiaque, l'épilepsie et la douleur chronique [142]. Les lipides deviennent donc maintenant un outil important dans la recherche de nouvelles substances avec

des propriétés lipo-électriques. C'est dans cette lignée qu'un composé de petite taille (PiMa) favorisant l'ouverture du canal Shaker par effet électrostatique a été développé [237]. Les travaux du même groupe de recherche sur les acides gras polyinsaturés (PUFAs) ont démontré qu'un changement de diète orientée vers ce type de lipides pouvait induire un déplacement hyperpolarisant de la courbe conductance-voltage des canaux Kv chez des patients épileptiques [144].

L'excitabilité cellulaire peut également être modulée, en affectant l'activation des Kv mais également l'activation et l'inactivation des canaux Nav. Une lipase (SmaseD) peut activer des Kv au potentiel de repos de la membrane en déplaçant son activation vers des potentiels hyperpolarisés, et ce, même dans des cellules non excitables [145]. Les effets rapportés sont spécifiques au type cellulaire, et donc, à la composition lipidique. En ciblant un lipide mineur, la modification de lipides permettrait une cible de plus grande spécificité d'un point de vue pharmacologique. La possibilité de pouvoir modifier l'activation des canaux ioniques dépendants du voltage et/ou d'affecter l'excitabilité électrique de la membrane cellulaire de façon enzymatique a des implications pharmacologiques importantes.

Nous avons suggéré des sites possibles d'interaction, ou de liaison, pour les lipides à différents endroits de KvAP. Plusieurs indications laissent penser que des sites de liaison pour les lipides existent réellement. Les récents succès de cristallisation de protéines membranaires en présence de lipides indiquent l'implication de molécules de lipides individuelles avec la protéine et les sites d'interactions électrostatiques rapportés ont une portée d'action de l'ordre de 2-3 Å.

L'influence des lipides sur l'état conformationnel et l'activité des canaux ioniques dépendants du voltage prend une importance de moins en moins négligeable lors de l'étude de ceux-ci. En raison de la sensibilité marquée des canaux Kv aux lipides de son environnement, toute description de son comportement n'a de sens que dans un contexte donné de lipides. La majorité des structures actuelles ont été résolues dans des conditions de membrane modèle éloignées de ce qu'on retrouve normalement dans une membrane naturelle: aucune asymétrie et une grande homogénéité. Jusqu'à présent, les interactions canaux-lipides en environnement natif demeurent peu comprises. Bien que la modification de lipides *in situ* par clivage

enzymatique soit un outil utile [135-137, 145], les effets observés sur les canaux peuvent être médiés soit par liaison spécifique des lipides à la protéine, ou soit par modification des caractéristiques physiques de la membrane [238]. Différencier ces effets est un défi en soi, car tout changement dans la composition lipidique induit de multiples changements dans les propriétés de la membrane.

L'importance de la modulation fine des canaux ioniques est cruciale, que ce soit en agissant sur la force ou l'efficacité du couplage électromécanique ou par l'influence des lipides environnants. Le but ultime est de réussir à voir en temps réel à une résolution atomique un canal ionique dépendant du voltage en fonction dans une membrane. Cela permettrait de comprendre enfin exactement la relation structure-fonction ainsi que le rôle exact de l'environnement lipidique. La compréhension des bases structurales de la fonction des canaux ioniques dépendants du voltage est non seulement fondamentale pour la détermination du contrôle électrique des protéines dans la membrane, mais aussi à l'établissement de fondations solides au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour des pathologies causées par la dysfonction de ces canaux.

BIBLIOGRAPHIE

1. Hille, B., *Ion channels of excitable membranes*. third ed. 2001, Sunderland, Massachusetts, USA: Sinauer. 814.
2. Ashcroft, F.M., *Ion Channels and Disease*. 2000: Academic Press. 481.
3. MacKinnon, R., *Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel*. *Nature*, 1991. **350**(6315): p. 232-5.
4. Long, S.B., E.B. Campbell, and R. Mackinnon, *Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel*. *Science*, 2005. **309**(5736): p. 897-903.
5. Doyle, D.A., et al., *The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity*. *Science*, 1998. **280**(5360): p. 69-77.
6. Bezanilla, F., *The voltage sensor in voltage-dependent ion channels*. *Physiol Rev*, 2000. **80**(2): p. 555-92.
7. Sokolova, O., L. Kolmakova-Partensky, and N. Grigorieff, *Three-dimensional structure of a voltage-gated potassium channel at 2.5 nm resolution*. *Structure*, 2001. **9**(3): p. 215-20.
8. Schulteis, C.T., N. Nagaya, and D.M. Papazian, *Intersubunit interaction between amino- and carboxyl-terminal cysteine residues in tetrameric shaker K⁺ channels*. *Biochemistry*, 1996. **35**(37): p. 12133-40.
9. Sigworth, F.J., *Voltage gating of ion channels*. *Q Rev Biophys*, 1994. **27**(1): p. 1-40.
10. Liu, Y., M.E. Jurman, and G. Yellen, *Dynamic rearrangement of the outer mouth of a K⁺ channel during gating*. *Neuron*, 1996. **16**(4): p. 859-67.
11. Liu, Y., et al., *Gated access to the pore of a voltage-dependent K⁺ channel*. *Neuron*, 1997. **19**(1): p. 175-84.
12. Loots, E. and E.Y. Isacoff, *Protein rearrangements underlying slow inactivation of the Shaker K⁺ channel*. *J Gen Physiol*, 1998. **112**(4): p. 377-89.
13. Holmgren, M., K.S. Shin, and G. Yellen, *The activation gate of a voltage-gated K⁺ channel can be trapped in the open state by an intersubunit metal bridge*. *Neuron*, 1998. **21**(3): p. 617-21.
14. Hodgkin, A.L. and A.F. Huxley, *A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve*. *J Physiol*, 1952. **117**(4): p. 500-44.
15. Noda, M., et al., *Primary structure of Electrophorus electricus sodium channel deduced from cDNA sequence*. *Nature*, 1984. **312**(5990): p. 121-7.
16. Tanabe, T., et al., *Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle*. *Nature*, 1987. **328**(6128): p. 313-8.
17. Papazian, D.M., et al., *Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from Drosophila*. *Science*, 1987. **237**(4816): p. 749-53.
18. Tempel, B.L., et al., *Sequence of a probable potassium channel component encoded at Shaker locus of Drosophila*. *Science*, 1987. **237**(4816): p. 770-5.
19. Jiang, Y., et al., *X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel*. *Nature*, 2003. **423**(6935): p. 33-41.
20. Long, S.B., E.B. Campbell, and R. Mackinnon, *Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling*. *Science*, 2005. **309**(5736): p. 903-8.
21. Vargas, E., et al., *An emerging consensus on voltage-dependent gating from computational modeling and molecular dynamics simulations*. *J Gen Physiol*, 2012. **140**(6): p. 587-94.
22. Schoppa, N.E., et al., *The size of gating charge in wild-type and mutant Shaker potassium channels*. *Science*, 1992. **255**(5052): p. 1712-5.

23. Hirschberg, B., et al., *Transfer of twelve charges is needed to open skeletal muscle Na⁺ channels*. J Gen Physiol, 1995. **106**(6): p. 1053-68.
24. Noceti, F., et al., *Effective gating charges per channel in voltage-dependent K⁺ and Ca²⁺ channels*. J Gen Physiol, 1996. **108**(3): p. 143-55.
25. Aggarwal, S.K. and R. MacKinnon, *Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker K⁺ channel*. Neuron, 1996. **16**(6): p. 1169-77.
26. Seoh, S.A., et al., *Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K⁺ channel*. Neuron, 1996. **16**(6): p. 1159-67.
27. Catterall, W.A., *Molecular properties of voltage-sensitive sodium channels*. Annu Rev Biochem, 1986. **55**: p. 953-85.
28. Guy, H.R. and P. Seetharamulu, *Molecular model of the action potential sodium channel*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(2): p. 508-12.
29. Liman, E.R., et al., *Voltage-sensing residues in the S4 region of a mammalian K⁺ channel*. Nature, 1991. **353**(6346): p. 752-6.
30. Papazian, D.M., et al., *Alteration of voltage-dependence of Shaker potassium channel by mutations in the S4 sequence*. Nature, 1991. **349**(6307): p. 305-10.
31. Bezanilla, F., *Voltage sensor movements*. J Gen Physiol, 2002. **120**(4): p. 465-73.
32. Armstrong, C.M. and F. Bezanilla, *Currents related to movement of the gating particles of the sodium channels*. Nature, 1973. **242**(5398): p. 459-61.
33. Keynes, R.D. and E. Rojas, *Kinetics and steady-state properties of the charged system controlling sodium conductance in the squid giant axon*. J Physiol, 1974. **239**(2): p. 393-434.
34. Schneider, M.F. and W.K. Chandler, *Voltage dependent charge movement of skeletal muscle: a possible step in excitation-contraction coupling*. Nature, 1973. **242**(5395): p. 244-6.
35. Kuzmenkin, A., F. Bezanilla, and A.M. Correa, *Gating of the bacterial sodium channel, NaChBac: voltage-dependent charge movement and gating currents*. J Gen Physiol, 2004. **124**(4): p. 349-56.
36. Starace, D.M., E. Stefani, and F. Bezanilla, *Voltage-dependent proton transport by the voltage sensor of the Shaker K⁺ channel*. Neuron, 1997. **19**(6): p. 1319-27.
37. Starace, D.M. and F. Bezanilla, *Histidine scanning mutagenesis of basic residues of the S4 segment of the shaker k⁺ channel*. J Gen Physiol, 2001. **117**(5): p. 469-90.
38. Yang, N., A.L. George, Jr., and R. Horn, *Molecular basis of charge movement in voltage-gated sodium channels*. Neuron, 1996. **16**(1): p. 113-22.
39. Yusaf, S.P., D. Wray, and A. Sivaprasadarao, *Measurement of the movement of the S4 segment during the activation of a voltage-gated potassium channel*. Pflugers Arch, 1996. **433**(1-2): p. 91-7.
40. Baker, O.S., et al., *Three transmembrane conformations and sequence-dependent displacement of the S4 domain in shaker K⁺ channel gating*. Neuron, 1998. **20**(6): p. 1283-94.
41. Larsson, H.P., et al., *Transmembrane movement of the shaker K⁺ channel S4*. Neuron, 1996. **16**(2): p. 387-97.
42. Yang, N. and R. Horn, *Evidence for voltage-dependent S4 movement in sodium channels*. Neuron, 1995. **15**(1): p. 213-8.
43. Yang, N., A.L. George, Jr., and R. Horn, *Probing the outer vestibule of a sodium channel voltage sensor*. Biophys J, 1997. **73**(5): p. 2260-8.
44. Islas, L.D. and F.J. Sigworth, *Electrostatics and the gating pore of Shaker potassium channels*. J Gen Physiol, 2001. **117**(1): p. 69-89.
45. Asamoah, O.K., et al., *A fluorometric approach to local electric field measurements in a voltage-gated ion channel*. Neuron, 2003. **37**(1): p. 85-97.

46. Starace, D.M. and F. Bezanilla, *A proton pore in a potassium channel voltage sensor reveals a focused electric field*. Nature, 2004. **427**(6974): p. 548-53.
47. Ahern, C.A. and R. Horn, *Focused electric field across the voltage sensor of potassium channels*. Neuron, 2005. **48**(1): p. 25-9.
48. Freites, J.A., D.J. Tobias, and S.H. White, *A voltage-sensor water pore*. Biophys J, 2006. **91**(11): p. L90-2.
49. Sands, Z.A. and M.S. Sansom, *How does a voltage sensor interact with a lipid bilayer? Simulations of a potassium channel domain*. Structure, 2007. **15**(2): p. 235-44.
50. Jogini, V. and B. Roux, *Dynamics of the Kv1.2 voltage-gated K⁺ channel in a membrane environment*. Biophys J, 2007. **93**(9): p. 3070-82.
51. Yarov-Yarovoy, V., et al., *Structural basis for gating charge movement in the voltage sensor of a sodium channel*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(2): p. E93-102.
52. Ahern, C.A. and R. Horn, *Specificity of charge-carrying residues in the voltage sensor of potassium channels*. J Gen Physiol, 2004. **123**(3): p. 205-16.
53. Bezanilla, F., E. Perozo, and E. Stefani, *Gating of Shaker K⁺ channels: II. The components of gating currents and a model of channel activation*. Biophys J, 1994. **66**(4): p. 1011-21.
54. Schoppa, N.E. and F.J. Sigworth, *Activation of Shaker potassium channels. III. An activation gating model for wild-type and V2 mutant channels*. J Gen Physiol, 1998. **111**(2): p. 313-42.
55. Stefani, E., et al., *Gating of Shaker K⁺ channels: I. Ionic and gating currents*. Biophys J, 1994. **66**(4): p. 996-1010.
56. Papazian, D.M., et al., *Electrostatic interactions of S4 voltage sensor in Shaker K⁺ channel*. Neuron, 1995. **14**(6): p. 1293-301.
57. Tiwari-Woodruff, S.K., et al., *Voltage-dependent structural interactions in the Shaker K(+) channel*. J Gen Physiol, 2000. **115**(2): p. 123-38.
58. Tiwari-Woodruff, S.K., et al., *Electrostatic interactions between transmembrane segments mediate folding of Shaker K⁺ channel subunits*. Biophys J, 1997. **72**(4): p. 1489-500.
59. Monks, S.A., D.J. Needleman, and C. Miller, *Helical structure and packing orientation of the S2 segment in the Shaker K⁺ channel*. J Gen Physiol, 1999. **113**(3): p. 415-23.
60. Li-Smerin, Y., D.H. Hackos, and K.J. Swartz, *alpha-helical structural elements within the voltage-sensing domains of a K(+) channel*. J Gen Physiol, 2000. **115**(1): p. 33-50.
61. Hong, K.H. and C. Miller, *The lipid-protein interface of a Shaker K(+) channel*. J Gen Physiol, 2000. **115**(1): p. 51-8.
62. Li-Smerin, Y. and K.J. Swartz, *Helical structure of the COOH terminus of S3 and its contribution to the gating modifier toxin receptor in voltage-gated ion channels*. J Gen Physiol, 2001. **117**(3): p. 205-18.
63. Grabe, M., et al., *A quantitative assessment of models for voltage-dependent gating of ion channels*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(51): p. 17640-5.
64. Hessa, T., S.H. White, and G. von Heijne, *Membrane insertion of a potassium-channel voltage sensor*. Science, 2005. **307**(5714): p. 1427.
65. Monticelli, L., et al., *Computer simulation of the KvAP voltage-gated potassium channel: steered molecular dynamics of the voltage sensor*. FEBS Lett, 2004. **564**(3): p. 325-32.
66. Freites, J.A., et al., *Interface connections of a transmembrane voltage sensor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(42): p. 15059-64.
67. Laine, M., et al., *Atomic proximity between S4 segment and pore domain in Shaker potassium channels*. Neuron, 2003. **39**(3): p. 467-81.
68. Broomand, A., et al., *Molecular movement of the voltage sensor in a K channel*. J Gen Physiol, 2003. **122**(6): p. 741-8.

69. Gandhi, C.S., et al., *The orientation and molecular movement of a k(+) channel voltage-sensing domain*. *Neuron*, 2003. **40**(3): p. 515-25.
70. Laine, M., D.M. Papazian, and B. Roux, *Critical assessment of a proposed model of Shaker*. *FEBS Lett*, 2004. **564**(3): p. 257-63.
71. Cuello, L.G., D.M. Cortes, and E. Perozo, *Molecular architecture of the KvAP voltage-dependent K+ channel in a lipid bilayer*. *Science*, 2004. **306**(5695): p. 491-5.
72. Posson, D.J., et al., *Small vertical movement of a K+ channel voltage sensor measured with luminescence energy transfer*. *Nature*, 2005. **436**(7052): p. 848-51.
73. Chanda, B., et al., *Gating charge displacement in voltage-gated ion channels involves limited transmembrane movement*. *Nature*, 2005. **436**(7052): p. 852-6.
74. Long, S.B., et al., *Atomic structure of a voltage-dependent K+ channel in a lipid membrane-like environment*. *Nature*, 2007. **450**(7168): p. 376-82.
75. Payandeh, J., et al., *The crystal structure of a voltage-gated sodium channel*. *Nature*, 2011. **475**(7356): p. 353-8.
76. Clayton, G.M., et al., *Structure of the transmembrane regions of a bacterial cyclic nucleotide-regulated channel*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(5): p. 1511-5.
77. Zhang, X., et al., *Crystal structure of an orthologue of the NaChBac voltage-gated sodium channel*. *Nature*, 2012. **486**(7401): p. 130-4.
78. DeCaen, P.G., et al., *Gating charge interactions with the S1 segment during activation of a Na+ channel voltage sensor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(46): p. 18825-30.
79. Campos, F.V., et al., *Two atomic constraints unambiguously position the S4 segment relative to S1 and S2 segments in the closed state of Shaker K channel*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(19): p. 7904-9.
80. DeCaen, P.G., et al., *Sequential formation of ion pairs during activation of a sodium channel voltage sensor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(52): p. 22498-503.
81. DeCaen, P.G., et al., *Disulfide locking a sodium channel voltage sensor reveals ion pair formation during activation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(39): p. 15142-7.
82. Broomand, A. and F. Elinder, *Large-scale movement within the voltage-sensor paddle of a potassium channel-support for a helical-screw motion*. *Neuron*, 2008. **59**(5): p. 770-7.
83. Li, Q., et al., *Structural mechanism of voltage-dependent gating in an isolated voltage-sensing domain*. *Nat Struct Mol Biol*, 2014. **21**(3): p. 244-52.
84. Tao, X., et al., *A gating charge transfer center in voltage sensors*. *Science*, 2010. **328**(5974): p. 67-73.
85. Zagotta, W.N., T. Hoshi, and R.W. Aldrich, *Shaker potassium channel gating. III: Evaluation of kinetic models for activation*. *J Gen Physiol*, 1994. **103**(2): p. 321-62.
86. Zagotta, W.N., et al., *Shaker potassium channel gating. II: Transitions in the activation pathway*. *J Gen Physiol*, 1994. **103**(2): p. 279-319.
87. Schoppa, N.E. and F.J. Sigworth, *Activation of shaker potassium channels. I. Characterization of voltage-dependent transitions*. *J Gen Physiol*, 1998. **111**(2): p. 271-94.
88. Yifrach, O. and R. MacKinnon, *Energetics of pore opening in a voltage-gated K(+) channel*. *Cell*, 2002. **111**(2): p. 231-9.
89. Pathak, M., et al., *The cooperative voltage sensor motion that gates a potassium channel*. *J Gen Physiol*, 2005. **125**(1): p. 57-69.
90. Ledwell, J.L. and R.W. Aldrich, *Mutations in the S4 region isolate the final voltage-dependent cooperative step in potassium channel activation*. *J Gen Physiol*, 1999. **113**(3): p. 389-414.
91. Smith-Maxwell, C.J., J.L. Ledwell, and R.W. Aldrich, *Role of the S4 in cooperativity of voltage-dependent potassium channel activation*. *J Gen Physiol*, 1998. **111**(3): p. 399-420.

92. Villalba-Galea, C.A., et al., *S4-based voltage sensors have three major conformations*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(46): p. 17600-7.
93. Elinder, F., R. Mannikko, and H.P. Larsson, *S4 charges move close to residues in the pore domain during activation in a K channel*. J Gen Physiol, 2001. **118**(1): p. 1-10.
94. Jiang, Y., et al., *The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel*. Nature, 2003. **423**(6935): p. 42-8.
95. Lee, S.Y., et al., *Structure of the KvAP voltage-dependent K⁺ channel and its dependence on the lipid membrane*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(43): p. 15441-6.
96. Lee, S.Y. and R. MacKinnon, *A membrane-access mechanism of ion channel inhibition by voltage sensor toxins from spider venom*. Nature, 2004. **430**(6996): p. 232-5.
97. Schonherr, R., et al., *Conformational switch between slow and fast gating modes: allosteric regulation of voltage sensor mobility in the EAG K⁺ channel*. Neuron, 2002. **35**(5): p. 935-49.
98. Cha, A. and F. Bezanilla, *Characterizing voltage-dependent conformational changes in the Shaker K⁺ channel with fluorescence*. Neuron, 1997. **19**(5): p. 1127-40.
99. Mannuzzu, L.M., M.M. Moronne, and E.Y. Isacoff, *Direct physical measure of conformational rearrangement underlying potassium channel gating*. Science, 1996. **271**(5246): p. 213-6.
100. Glauner, K.S., et al., *Spectroscopic mapping of voltage sensor movement in the Shaker potassium channel*. Nature, 1999. **402**(6763): p. 813-7.
101. Cha, A., et al., *Atomic scale movement of the voltage-sensing region in a potassium channel measured via spectroscopy*. Nature, 1999. **402**(6763): p. 809-13.
102. Blaustein, R.O., et al., *Tethered blockers as molecular 'tape measures' for a voltage-gated K⁺ channel*. Nat Struct Biol, 2000. **7**(4): p. 309-11.
103. Bezanilla, F., *The voltage-sensor structure in a voltage-gated channel*. Trends Biochem Sci, 2005. **30**(4): p. 166-8.
104. Tombola, F., M.M. Pathak, and E.Y. Isacoff, *Voltage-sensing arginines in a potassium channel permeate and occlude cation-selective pores*. Neuron, 2005. **45**(3): p. 379-88.
105. Tombola, F., et al., *The twisted ion-permeation pathway of a resting voltage-sensing domain*. Nature, 2007. **445**(7127): p. 546-9.
106. Durell, S.R., Y. Hao, and H.R. Guy, *Structural models of the transmembrane region of voltage-gated and other K⁺ channels in open, closed, and inactivated conformations*. J Struct Biol, 1998. **121**(2): p. 263-84.
107. Keynes, R.D. and F. Elinder, *The screw-helical voltage gating of ion channels*. Proc Biol Sci, 1999. **266**(1421): p. 843-52.
108. Goldstein, S.A., *A structural vignette common to voltage sensors and conduction pores: canaliculi*. Neuron, 1996. **16**(4): p. 717-22.
109. Durell, S.R., I.H. Shrivastava, and H.R. Guy, *Models of the structure and voltage-gating mechanism of the shaker K⁺ channel*. Biophys J, 2004. **87**(4): p. 2116-30.
110. Lecar, H., H.P. Larsson, and M. Grabe, *Electrostatic model of S4 motion in voltage-gated ion channels*. Biophys J, 2003. **85**(5): p. 2854-64.
111. Ahern, C.A. and R. Horn, *Stirring up controversy with a voltage sensor paddle*. Trends Neurosci, 2004. **27**(6): p. 303-7.
112. Lewis, A., et al., *Atomic constraints between the voltage sensor and the pore domain in a voltage-gated K⁺ channel of known structure*. J Gen Physiol, 2008. **131**(6): p. 549-61.
113. Ruta, V., J. Chen, and R. MacKinnon, *Calibrated measurement of gating-charge arginine displacement in the KvAP voltage-dependent K⁺ channel*. Cell, 2005. **123**(3): p. 463-75.
114. Tombola, F., M.M. Pathak, and E.Y. Isacoff, *How does voltage open an ion channel?* Annu Rev Cell Dev Biol, 2006. **22**: p. 23-52.

115. Banerjee, A., et al., *Structure of a pore-blocking toxin in complex with a eukaryotic voltage-dependent K(+) channel*. *Elife*, 2013. **2**: p. e00594.
116. Chen, X., et al., *Structure of the full-length Shaker potassium channel Kv1.2 by normal-mode-based X-ray crystallographic refinement*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(25): p. 11352-7.
117. Payandeh, J., et al., *Crystal structure of a voltage-gated sodium channel in two potentially inactivated states*. *Nature*, 2012. **486**(7401): p. 135-9.
118. Vargas, E., F. Bezanilla, and B. Roux, *In search of a consensus model of the resting state of a voltage-sensing domain*. *Neuron*, 2011. **72**(5): p. 713-20.
119. Yarov-Yarovoy, V., D. Baker, and W.A. Catterall, *Voltage sensor conformations in the open and closed states in ROSETTA structural models of K(+) channels*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(19): p. 7292-7.
120. Pathak, M.M., et al., *Closing in on the resting state of the Shaker K(+) channel*. *Neuron*, 2007. **56**(1): p. 124-40.
121. Khalili-Araghi, F., et al., *Calculation of the gating charge for the Kv1.2 voltage-activated potassium channel*. *Biophys J*, 2010. **98**(10): p. 2189-98.
122. Delemotte, L., et al., *Intermediate states of the Kv1.2 voltage sensor from atomistic molecular dynamics simulations*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(15): p. 6109-14.
123. Delemotte, L., et al., *Effect of sensor domain mutations on the properties of voltage-gated ion channels: molecular dynamics studies of the potassium channel Kv1.2*. *Biophys J*, 2010. **99**(9): p. L72-4.
124. Henrion, U., et al., *Tracking a complete voltage-sensor cycle with metal-ion bridges*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(22): p. 8552-7.
125. Lin, M.C., J. Abramson, and D.M. Papazian, *Transfer of ion binding site from ether-a-go-go to Shaker: Mg²⁺ binds to resting state to modulate channel opening*. *J Gen Physiol*, 2010. **135**(5): p. 415-31.
126. Schwaiger, C.S., et al., *3(1)0-helix conformation facilitates the transition of a voltage sensor S4 segment toward the down state*. *Biophys J*, 2011. **100**(6): p. 1446-54.
127. Jensen, M.O., et al., *Mechanism of voltage gating in potassium channels*. *Science*, 2012. **336**(6078): p. 229-33.
128. Bjelkmar, P., et al., *Conformational changes and slow dynamics through microsecond polarized atomistic molecular simulation of an integral Kv1.2 ion channel*. *PLoS Comput Biol*, 2009. **5**(2): p. e1000289.
129. Vieira-Pires, R.S. and J.H. Morais-Cabral, *3(10) helices in channels and other membrane proteins*. *J Gen Physiol*, 2010. **136**(6): p. 585-92.
130. Catterall, W.A., *Ion channel voltage sensors: structure, function, and pathophysiology*. *Neuron*, 2010. **67**(6): p. 915-28.
131. Chakrapani, S., et al., *The activated state of a sodium channel voltage sensor in a membrane environment*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(12): p. 5435-40.
132. Nishizawa, M. and K. Nishizawa, *Molecular dynamics simulation of Kv channel voltage sensor helix in a lipid membrane with applied electric field*. *Biophys J*, 2008. **95**(4): p. 1729-44.
133. Nishizawa, M. and K. Nishizawa, *Coupling of S4 helix translocation and S6 gating analyzed by molecular-dynamics simulations of mutated Kv channels*. *Biophys J*, 2009. **97**(1): p. 90-100.
134. Freitas, J.A., et al., *Microscopic origin of gating current fluctuations in a potassium channel voltage sensor*. *Biophys J*, 2012. **102**(11): p. L44-6.
135. Ramu, Y., Y. Xu, and Z. Lu, *Inhibition of CFTR Cl⁻ channel function caused by enzymatic hydrolysis of sphingomyelin*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(15): p. 6448-53.

136. Ramu, Y., Y. Xu, and Z. Lu, *Enzymatic activation of voltage-gated potassium channels*. *Nature*, 2006. **442**(7103): p. 696-9.
137. Xu, Y., Y. Ramu, and Z. Lu, *Removal of phospho-head groups of membrane lipids immobilizes voltage sensors of K⁺ channels*. *Nature*, 2008. **451**(7180): p. 826-9.
138. Schmidt, D., Q.X. Jiang, and R. MacKinnon, *Phospholipids and the origin of cationic gating charges in voltage sensors*. *Nature*, 2006. **444**(7120): p. 775-9.
139. Jiang, Q.X. and T. Gonen, *The influence of lipids on voltage-gated ion channels*. *Curr Opin Struct Biol*, 2012. **22**(4): p. 529-36.
140. Zheng, H., et al., *Lipid-dependent gating of a voltage-gated potassium channel*. *Nat Commun*, 2011. **2**: p. 250.
141. Borjesson, S.I. and F. Elinder, *An electrostatic potassium channel opener targeting the final voltage sensor transition*. *J Gen Physiol*, 2011. **137**(6): p. 563-77.
142. Borjesson, S.I., S. Hammarstrom, and F. Elinder, *Lipoelectric modification of ion channel voltage gating by polyunsaturated fatty acids*. *Biophys J*, 2008. **95**(5): p. 2242-53.
143. Borjesson, S.I., et al., *Electrostatic tuning of cellular excitability*. *Biophys J*, 2010. **98**(3): p. 396-403.
144. Xu, X.P., et al., *Polyunsaturated fatty acids and cerebrospinal fluid from children on the ketogenic diet open a voltage-gated K channel: a putative mechanism of antiseizure action*. *Epilepsy Res*, 2008. **80**(1): p. 57-66.
145. Combs, D.J., et al., *Tuning voltage-gated channel activity and cellular excitability with a sphingomyelinase*. *J Gen Physiol*, 2013. **142**(4): p. 367-80.
146. Chakrapani, S., et al., *Structural dynamics of an isolated voltage-sensor domain in a lipid bilayer*. *Structure*, 2008. **16**(3): p. 398-409.
147. Milescu, M., et al., *Interactions between lipids and voltage sensor paddles detected with tarantula toxins*. *Nat Struct Mol Biol*, 2009. **16**(10): p. 1080-5.
148. Milescu, M., et al., *Tarantula toxins interact with voltage sensors within lipid membranes*. *J Gen Physiol*, 2007. **130**(5): p. 497-511.
149. Schow, E.V., et al., *Down-state model of the voltage-sensing domain of a potassium channel*. *Biophys J*, 2010. **98**(12): p. 2857-66.
150. Treptow, W. and M. Tarek, *Environment of the gating charges in the Kv1.2 Shaker potassium channel*. *Biophys J*, 2006. **90**(9): p. L64-6.
151. Soubias, O. and K. Gawrisch, *Probing specific lipid-protein interaction by saturation transfer difference NMR spectroscopy*. *J Am Chem Soc*, 2005. **127**(38): p. 13110-1.
152. Krepiy, D., K. Gawrisch, and K.J. Swartz, *Structural interactions between lipids, water and S1-S4 voltage-sensing domains*. *J Mol Biol*, 2012. **423**(4): p. 632-47.
153. Krepiy, D., et al., *Structure and hydration of membranes embedded with voltage-sensing domains*. *Nature*, 2009. **462**(7272): p. 473-9.
154. Mokrab, Y. and M.S. Sansom, *Interaction of diverse voltage sensor homologs with lipid bilayers revealed by self-assembly simulations*. *Biophys J*, 2011. **100**(4): p. 875-84.
155. Bond, P.J. and M.S. Sansom, *Bilayer deformation by the Kv channel voltage sensor domain revealed by self-assembly simulations*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(8): p. 2631-6.
156. Xu, Y., Y. Ramu, and Z. Lu, *A shaker K⁺ channel with a miniature engineered voltage sensor*. *Cell*, 2010. **142**(4): p. 580-9.
157. Li, Q., et al., *Structural basis of lipid-driven conformational transitions in the KvAP voltage-sensing domain*. *Nat Struct Mol Biol*, 2014.
158. Valiyaveetil, F.I., Y. Zhou, and R. MacKinnon, *Lipids in the structure, folding, and function of the KcsA K⁺ channel*. *Biochemistry*, 2002. **41**(35): p. 10771-7.

159. D'Avanzo, N., et al., *Differential lipid dependence of the function of bacterial sodium channels*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e61216.
160. del Camino, D. and G. Yellen, *Tight steric closure at the intracellular activation gate of a voltage-gated K(+) channel*. Neuron, 2001. **32**(4): p. 649-56.
161. Swartz, K.J., *Opening the gate in potassium channels*. Nat Struct Mol Biol, 2004. **11**(6): p. 499-501.
162. Webster, S.M., et al., *Intracellular gate opening in Shaker K+ channels defined by high-affinity metal bridges*. Nature, 2004. **428**(6985): p. 864-8.
163. del Camino, D., M. Kanevsky, and G. Yellen, *Status of the intracellular gate in the activated-not-open state of shaker K+ channels*. J Gen Physiol, 2005. **126**(5): p. 419-28.
164. Lu, Z., A.M. Klem, and Y. Ramu, *Coupling between voltage sensors and activation gate in voltage-gated K+ channels*. J Gen Physiol, 2002. **120**(5): p. 663-76.
165. Lu, Z., A.M. Klem, and Y. Ramu, *Ion conduction pore is conserved among potassium channels*. Nature, 2001. **413**(6858): p. 809-13.
166. Arrigoni, C., et al., *The voltage-sensing domain of a phosphatase gates the pore of a potassium channel*. J Gen Physiol, 2013. **141**(3): p. 389-95.
167. Murata, Y., et al., *Phosphoinositide phosphatase activity coupled to an intrinsic voltage sensor*. Nature, 2005. **435**(7046): p. 1239-43.
168. Li-Smerin, Y., D.H. Hackos, and K.J. Swartz, *A localized interaction surface for voltage-sensing domains on the pore domain of a K+ channel*. Neuron, 2000. **25**(2): p. 411-23.
169. Blunck, R. and Z. Batulan, *Mechanism of electromechanical coupling in voltage-gated potassium channels*. Front Pharmacol, 2012. **3**: p. 166.
170. Schoppa, N.E. and F.J. Sigworth, *Activation of Shaker potassium channels. II. Kinetics of the V2 mutant channel*. J Gen Physiol, 1998. **111**(2): p. 295-311.
171. Sanguinetti, M.C. and Q.P. Xu, *Mutations of the S4-S5 linker alter activation properties of HERG potassium channels expressed in Xenopus oocytes*. J Physiol, 1999. **514** (Pt 3): p. 667-75.
172. Ferrer, T., et al., *The S4-S5 linker directly couples voltage sensor movement to the activation gate in the human ether-a'-go-go-related gene (hERG) K+ channel*. J Biol Chem, 2006. **281**(18): p. 12858-64.
173. Slesinger, P.A., Y.N. Jan, and L.Y. Jan, *The S4-S5 loop contributes to the ion-selective pore of potassium channels*. Neuron, 1993. **11**(4): p. 739-49.
174. Chen, J., et al., *The S4-S5 linker couples voltage sensing and activation of pacemaker channels*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(20): p. 11277-82.
175. Decher, N., J. Chen, and M.C. Sanguinetti, *Voltage-dependent gating of hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated pacemaker channels: molecular coupling between the S4-S5 and C-linkers*. J Biol Chem, 2004. **279**(14): p. 13859-65.
176. Isacoff, E.Y., Y.N. Jan, and L.Y. Jan, *Putative receptor for the cytoplasmic inactivation gate in the Shaker K+ channel*. Nature, 1991. **353**(6339): p. 86-90.
177. McCormack, K., et al., *A role for hydrophobic residues in the voltage-dependent gating of Shaker K+ channels*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(7): p. 2931-5.
178. Soler-Llavina, G.J., T.H. Chang, and K.J. Swartz, *Functional interactions at the interface between voltage-sensing and pore domains in the Shaker K(v) channel*. Neuron, 2006. **52**(4): p. 623-34.
179. Labro, A.J., et al., *Kv channel gating requires a compatible S4-S5 linker and bottom part of S6, constrained by non-interacting residues*. J Gen Physiol, 2008. **132**(6): p. 667-80.

180. Haddad, G.A. and R. Blunck, *Mode shift of the voltage sensors in Shaker K⁺ channels is caused by energetic coupling to the pore domain*. J Gen Physiol, 2011. **137**(5): p. 455-72.
181. Lee, S.Y., A. Banerjee, and R. MacKinnon, *Two separate interfaces between the voltage sensor and pore are required for the function of voltage-dependent K⁺ channels*. PLoS Biol, 2009. **7**(3): p. e47.
182. Choveau, F.S., et al., *KCNQ1 channels voltage dependence through a voltage-dependent binding of the S4-S5 linker to the pore domain*. J Biol Chem, 2011. **286**(1): p. 707-16.
183. Batulan, Z., G.A. Haddad, and R. Blunck, *An intersubunit interaction between S4-S5 linker and S6 is responsible for the slow off-gating component in Shaker K⁺ channels*. J Biol Chem, 2010. **285**(18): p. 14005-19.
184. Tristani-Firouzi, M., J. Chen, and M.C. Sanguinetti, *Interactions between S4-S5 linker and S6 transmembrane domain modulate gating of HERG K⁺ channels*. J Biol Chem, 2002. **277**(21): p. 18994-9000.
185. Barghaan, J. and R. Bähring, *Dynamic coupling of voltage sensor and gate involved in closed-state inactivation of kv4.2 channels*. J Gen Physiol, 2009. **133**(2): p. 205-24.
186. Ding, S. and R. Horn, *Tail end of the s6 segment: role in permeation in shaker potassium channels*. J Gen Physiol, 2002. **120**(1): p. 87-97.
187. Ding, S. and R. Horn, *Effect of S6 tail mutations on charge movement in Shaker potassium channels*. Biophys J, 2003. **84**(1): p. 295-305.
188. Neale, E.J., et al., *Evidence for intersubunit interactions between S4 and S5 transmembrane segments of the Shaker potassium channel*. J Biol Chem, 2003. **278**(31): p. 29079-85.
189. Ding, S., et al., *Investigating the putative glycine hinge in Shaker potassium channel*. J Gen Physiol, 2005. **126**(3): p. 213-26.
190. Labro, A.J., et al., *The S4-S5 linker of KCNQ1 channels forms a structural scaffold with the S6 segment controlling gate closure*. J Biol Chem, 2011. **286**(1): p. 717-25.
191. Smith-Maxwell, C.J., J.L. Ledwell, and R.W. Aldrich, *Uncharged S4 residues and cooperativity in voltage-dependent potassium channel activation*. J Gen Physiol, 1998. **111**(3): p. 421-39.
192. Kalstrup, T. and R. Blunck, *Dynamics of internal pore opening in K(V) channels probed by a fluorescent unnatural amino acid*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(20): p. 8272-7.
193. Hackos, D.H., T.H. Chang, and K.J. Swartz, *Scanning the intracellular S6 activation gate in the shaker K⁺ channel*. J Gen Physiol, 2002. **119**(6): p. 521-32.
194. Vardanyan, V. and O. Pongs, *Coupling of voltage-sensors to the channel pore: a comparative view*. Front Pharmacol, 2012. **3**: p. 145.
195. Armstrong, C.M. and F. Bezanilla, *Inactivation of the sodium channel. II. Gating current experiments*. J Gen Physiol, 1977. **70**(5): p. 567-90.
196. Hoshi, T., W.N. Zagotta, and R.W. Aldrich, *Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation*. Science, 1990. **250**(4980): p. 533-8.
197. Zagotta, W.N., T. Hoshi, and R.W. Aldrich, *Restoration of inactivation in mutants of Shaker potassium channels by a peptide derived from ShB*. Science, 1990. **250**(4980): p. 568-71.
198. Kurata, H.T. and D. Fedida, *A structural interpretation of voltage-gated potassium channel inactivation*. Prog Biophys Mol Biol, 2006. **92**(2): p. 185-208.
199. Yellen, G., *The voltage-gated potassium channels and their relatives*. Nature, 2002. **419**(6902): p. 35-42.
200. Blunck, R., et al., *Detection of the opening of the bundle crossing in KcsA with fluorescence lifetime spectroscopy reveals the existence of two gates for ion conduction*. J Gen Physiol, 2006. **128**(5): p. 569-81.

201. Cordero-Morales, J.F., L.G. Cuello, and E. Perozo, *Voltage-dependent gating at the KcsA selectivity filter*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(4): p. 319-22.
202. Cordero-Morales, J.F., et al., *Molecular determinants of gating at the potassium-channel selectivity filter*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(4): p. 311-8.
203. Hoshi, T. and C.M. Armstrong, *C-type inactivation of voltage-gated K⁺ channels: pore constriction or dilation?* J Gen Physiol, 2013. **141**(2): p. 151-60.
204. Choi, K.L., R.W. Aldrich, and G. Yellen, *Tetraethylammonium blockade distinguishes two inactivation mechanisms in voltage-activated K⁺ channels*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(12): p. 5092-5.
205. Ogielska, E.M. and R.W. Aldrich, *Functional consequences of a decreased potassium affinity in a potassium channel pore. Ion interactions and C-type inactivation*. J Gen Physiol, 1999. **113**(2): p. 347-58.
206. Baukrowitz, T. and G. Yellen, *Modulation of K⁺ current by frequency and external [K⁺]: a tale of two inactivation mechanisms*. Neuron, 1995. **15**(4): p. 951-60.
207. Aldrich, R.W., Jr., P.A. Getting, and S.H. Thompson, *Inactivation of delayed outward current in molluscan neurone somata*. J Physiol, 1979. **291**: p. 507-30.
208. Marom, S. and I.B. Levitan, *State-dependent inactivation of the Kv3 potassium channel*. Biophys J, 1994. **67**(2): p. 579-89.
209. Klemic, K.G., et al., *Inactivation of Kv2.1 potassium channels*. Biophys J, 1998. **74**(4): p. 1779-89.
210. Bähring, R. and M. Covarrubias, *Mechanisms of closed-state inactivation in voltage-gated ion channels*. J Physiol, 2011. **589**(Pt 3): p. 461-79.
211. Jerng, H.H., P.J. Pfaffinger, and M. Covarrubias, *Molecular physiology and modulation of somatodendritic A-type potassium channels*. Mol Cell Neurosci, 2004. **27**(4): p. 343-69.
212. Armstrong, C.M., *Na channel inactivation from open and closed states*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(47): p. 17991-6.
213. Hodgkin, A.L. and A.F. Huxley, *The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of Loligo*. J Physiol, 1952. **116**(4): p. 497-506.
214. Horn, R., J. Patlak, and C.F. Stevens, *Sodium channels need not open before they inactivate*. Nature, 1981. **291**(5814): p. 426-7.
215. Bean, B.P., *Sodium channel inactivation in the crayfish giant axon. Must channels open before inactivating?* Biophys J, 1981. **35**(3): p. 595-614.
216. Aldrich, R.W. and C.F. Stevens, *Inactivation of open and closed sodium channels determined separately*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1983. **48 Pt 1**: p. 147-53.
217. Schmidt, D., S.R. Cross, and R. MacKinnon, *A gating model for the archeal voltage-dependent K(+) channel KvAP in DPhPC and POPE:POPG decane lipid bilayers*. J Mol Biol, 2009. **390**(5): p. 902-12.
218. Aldrich, R.W., *Inactivation of voltage-gated delayed potassium current in molluscan neurons. A kinetic model*. Biophys J, 1981. **36**(3): p. 519-32.
219. Marom, S. and L.F. Abbott, *Modeling state-dependent inactivation of membrane currents*. Biophys J, 1994. **67**(2): p. 515-20.
220. Klemic, K.G., G.E. Kirsch, and S.W. Jones, *U-type inactivation of Kv3.1 and Shaker potassium channels*. Biophys J, 2001. **81**(2): p. 814-26.
221. Bähring, R., et al., *Voltage sensor inactivation in potassium channels*. Front Pharmacol, 2012. **3**: p. 100.
222. Shahidullah, M. and M. Covarrubias, *The link between ion permeation and inactivation gating of Kv4 potassium channels*. Biophys J, 2003. **84**(2 Pt 1): p. 928-41.

223. Shin, K.S., et al., *Inactivation in HCN channels results from reclosure of the activation gate: desensitization to voltage*. *Neuron*, 2004. **41**(5): p. 737-44.
224. Armstrong, N., et al., *Measurement of conformational changes accompanying desensitization in an ionotropic glutamate receptor*. *Cell*, 2006. **127**(1): p. 85-97.
225. Elinder, F., P. Arhem, and H.P. Larsson, *Localization of the extracellular end of the voltage sensor S4 in a potassium channel*. *Biophys J*, 2001. **80**(4): p. 1802-9.
226. Lai, H.C., et al., *The S4 voltage sensor packs against the pore domain in the KAT1 voltage-gated potassium channel*. *Neuron*, 2005. **47**(3): p. 395-406.
227. Gagnon, D.G. and F. Bezanilla, *The contribution of individual subunits to the coupling of the voltage sensor to pore opening in Shaker K channels: effect of ILT mutations in heterotetramers*. *J Gen Physiol*, 2010. **136**(5): p. 555-68.
228. Kanevsky, M. and R.W. Aldrich, *Determinants of voltage-dependent gating and open-state stability in the S5 segment of Shaker potassium channels*. *J Gen Physiol*, 1999. **114**(2): p. 215-42.
229. Muroi, Y., et al., *Molecular determinants of coupling between the domain III voltage sensor and pore of a sodium channel*. *Nat Struct Mol Biol*, 2010. **17**(2): p. 230-7.
230. Islas, L.D. and F.J. Sigworth, *Voltage sensitivity and gating charge in Shaker and Shab family potassium channels*. *J Gen Physiol*, 1999. **114**(5): p. 723-42.
231. Ruta, V., et al., *Functional analysis of an archaeobacterial voltage-dependent K⁺ channel*. *Nature*, 2003. **422**(6928): p. 180-5.
232. Chen, J. and P.R. Selvin, *Thiol-reactive luminescent chelates of terbium and europium*. *Bioconjug Chem*, 1999. **10**(2): p. 311-5.
233. Ge, P. and P.R. Selvin, *Carbostyryl derivatives as antenna molecules for luminescent lanthanide chelates*. *Bioconjug Chem*, 2004. **15**(5): p. 1088-94.
234. Ge, P. and P.R. Selvin, *Thiol-reactive luminescent lanthanide chelates: part 2*. *Bioconjug Chem*, 2003. **14**(5): p. 870-6.
235. Sanders, C.R. and K.F. Mittendorf, *Tolerance to changes in membrane lipid composition as a selected trait of membrane proteins*. *Biochemistry*, 2011. **50**(37): p. 7858-67.
236. Phillips, L.R. and K.J. Swartz, *Position and motions of the S4 helix during opening of the Shaker potassium channel*. *J Gen Physiol*, 2010. **136**(6): p. 629-44.
237. Ottosson, N.E., S.I. Liin, and F. Elinder, *Drug-induced ion channel opening tuned by the voltage sensor charge profile*. *J Gen Physiol*, 2014. **143**(2): p. 173-82.
238. Schmidt, D. and R. MacKinnon, *Voltage-dependent K⁺ channel gating and voltage sensor toxin sensitivity depend on the mechanical state of the lipid membrane*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(49): p. 19276-81.

