

Université de Montréal

**Détermination des propriétés  
biophysiques et pharmacologiques des  
canaux potassiques cardiaques :  
importance des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$**

Par

Marc Pourrier

Département de Pharmacologie  
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la faculté des études supérieures en vue de l'obtention  
du grade de Docteur en Pharmacologie.

Mars 2004

© Marc Pourrier, 2004



W

4

U58

2004

V.147

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

# Identification du Jury

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

## **Détermination des propriétés biophysiques et pharmacologiques des canaux potassiques cardiaques : importance des sous-unités $\alpha$ et $\beta$**

Présentée par :

**Marc Pourrier**

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

**Dr Teresa Kus**  
Président-rapporteur

**Dr Stanley Nattel**  
Directeur de recherche

**Dr Zhiguo Wang**  
Codirecteur

**Dr Céline Fiset**  
Membre du jury

**Dr Alvin Shrier**  
Examineur externe

Représentant du doyen de la FES

## SOMMAIRE

Au cours des dix dernières années, une variété d'ADN complémentaires codant pour différentes sous-unités alpha ( $\alpha$ ), soit les sous-unités impliquées dans la formation du pore d'un canal, ont été clonées. Lorsque ces sous-unités sont exprimées dans des systèmes d'expression, elles possèdent des propriétés ioniques similaires aux courants potassiques cardiaques endogènes. Cependant, certaines discordances ont mené à la recherche de sous-unités complémentaires possiblement aussi impliquées dans la formation des courants endogènes cardiaques. Plusieurs sous-unités bêta ( $\beta$ ), ou sous-unités auxiliaires modulatrices de sous-unités  $\alpha$  ont ainsi été clonées. La plupart des canaux potassiques cardiaques se composent de sous-unités  $\alpha$  associées à des sous-unités  $\beta$ . Nos travaux ont consisté à étudier les propriétés biophysiques et pharmacologiques des canaux potassiques cardiaques. Nous avons ainsi émis l'hypothèse selon laquelle les propriétés de certains canaux potassiques endogènes peuvent être expliquées par les propriétés biophysiques et pharmacologiques de sous-unités  $\alpha$  Kv4.2, Kv3.4 et HERG parfois nécessitant l'interaction avec d'autres sous-unités.

Dans un premier temps, nous avons apporté de nouveaux éléments permettant une meilleure connaissance des mécanismes d'inactivation de Kv4.2, et étudié l'effet des agents pharmacologiques flécaïnide et quinidine sur Kv4.2. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence que la mutation de résidus valine situés dans le sixième segment transmembranaire en isoleucine ralentissait l'inactivation rapide de Kv4.2. Les mêmes résidus jouent également un rôle important dans la dépendance au volatage du bloc de la flécaïnide et de la quinidine.

Par la suite, nous nous sommes attachés à décrire les effets de KChIP2 sur les sous-unités  $\alpha$  Kv4.2 et Kv1.4, notamment en créant une protéine chimérique composée de l'extrémité N-terminale de Kv4.2 greffée à Kv1.4, elle-même amputée de son extrémité N-terminale. Nous avons établi que le transfert de l'extrémité N-terminale de Kv4.2 sur Kv1.4 lui conférait un certain nombre de ses propriétés telles que les cinétiques d'inactivation, la réactivation rapide après inactivation et

l'interaction avec KChIP2. Ceci révélant la capacité de Kv1.4 à montrer ces propriétés et la suffisance de la partie N-terminale de Kv4.2 pour les transmettre.

Nous avons également démontré que le niveau d'ARN messager et l'expression protéique de la sous-unité  $\beta$  MiRP1 était trop faible pour expliquer son rôle présumé dans les différentes régions du cœur, mais qu'elle était exprimée à des niveaux importants dans les fibres de Purkinje. Nous avons par la suite mis en évidence une nouvelle interaction entre la sous-unités  $\alpha$  Kv3.4 et MiRP1. Les deux sous-unités sont exprimées au niveau des fibres de Purkinje, suggérant ainsi un rôle dans les propriétés électrophysiologiques de ce tissu. MiRP1 ralentit les cinétiques d'inactivation de Kv3.4, ralentit la réactivation et modifie la sensibilité de Kv3.4 au TEA. Ces changements suggèrent une possible participation de MiRP1 dans le courant transitoire sortant dans les fibres de Purkinje.

Finalement, nous avons rapporté une interaction entre deux sous-unités  $\alpha$ , HERG et KvLQT1, respectivement responsables de la composante rapide et lente du courant sortant retardé à rectification. En effet, nous avons démontré que la sous-unité  $\alpha$  portant le courant  $I_{Ks}$  (KvLQT1) pouvait interagir et modifier la localisation et les propriétés ioniques de la sous-unité  $\alpha$  portant le courant  $I_{Kr}$  (HERG), établissant par le fait même de nouvelles évidences sur la fonction moléculaire du courant retardé à rectification cardiaque.

Basé sur ces études, nous pouvons conclure que des motifs moléculaires spécifiques sont importants afin d'expliquer les propriétés des canaux ioniques cardiaques et que les interactions entre différentes sous-unités sont importantes dans l'avancement des connaissances sur la fonction moléculaire des canaux ioniques endogènes.

Mots clés : Cœur, Canaux potassiques, Electrophysiologie, Repolarisation, Inactivation, Structure-fonction.

## SUMMARY

In the last 10 years, numerous cDNAs encoding pore-forming  $\alpha$ - subunits of cardiac ion channels have been cloned. When those subunits are expressed in mammalian expression systems, they carry currents generally resembling native cardiac currents. However, some discrepancies have led to the suggestion that other subunits might be involved in the formation of native currents. The discovery of the auxiliary  $\beta$ - subunits and the results of their co-expression with  $\alpha$ -subunits have provided a potential explanation for some of the discrepancies. Most of inactivating potassium channels are believed to be made up of both  $\alpha$  and  $\beta$  subunits. In this thesis, we examined the hypothesis that the properties of selected native potassium channels are explained by molecular properties of  $\alpha$ - subunits Kv4.2, Kv3.4 and HERG, in some cases requiring interaction with other subunits.

We first studied molecular determinants of Kv4.2 inactivation and of Kv4.2 interaction with the antiarrhythmic agents quinidine and flecainide. We found that replacement of critical valine residues in the sixth transmembrane segment by isoleucine slows fast inactivation of Kv4.2 and that the same residues play an important role in voltage dependent block by antiarrhythmic drugs.

We next analyzed the effects of the  $\beta$ -subunit KChIP2 on Kv4.2 and Kv1.4  $\alpha$ -subunits by creating a chimeric protein consisting of the N-terminal of Kv4.2 transferred to an N-terminal deleted Kv1.4 channel. We showed that the substitution of the Kv4.2 N-terminal for that of Kv1.4 transfers a variety of properties of Kv4.2, including inactivation kinetics, fast recovery from inactivation and KChIP2 interaction to Kv1.4, indicating the ability of Kv1.4 subunits to display these properties and the sufficiency of the Kv4.2 N-terminal to convey them.

We found that the RNA expression and protein level of the  $\beta$ -subunit MiRP1 is too low to explain its presumed functional role in various regions of the heart, but that it is strongly expressed in Purkinje fibers. We then found a new interaction between the  $\alpha$ - subunit Kv3.4 and MiRP1. Both subunits are strongly expressed in the Purkinje fiber network, suggesting a possible role in Purkinje fiber electrophysiology. MiRP1 slows Kv3.4 inactivation kinetics, slows recovery from inactivation and

affects the sensitivity of Kv3.4 for TEA, changes that suggest possible participation of MiRP1 in forming Purkinje fiber transient outward potassium current.

Finally, we demonstrated interactions between two  $\alpha$ -subunits, HERG and KvLQT1, responsible for the fast and slow component of the delayed rectifier potassium current, respectively. KvLQT1 was found to modify the localization and current-carrying properties of HERG, providing potentially novel insights into the molecular function of the delayed rectifier current system.

Based on these studies, we conclude that specific molecular motifs are important in conveying the properties of cardiac ion currents and that interactions between different subunits are important in considering the molecular basis of native ion channel function.

Key words: Heart, Potassium channels, Electrophysiology, Repolarization, Inactivation, Structure-function.



# TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	i
SUMMARY	iii
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES TABLEAUX	xv
LISTE DES FIGURES	xvi
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	xx
REMERCIEMENTS	xxii
CONTRIBUTION DES AUTEURS	xxiii
DÉDICACE	xxvi

## **PREMIÈRE PARTIE : INTRODUCTION ET REVUE DE LA LITTÉRATURE.**

1

### **CHAPITRE I : LES CANAUX POTASSIQUES DANS LA REPOLARISATION DES CELLULES CARDIAQUES**

2

Avant propos

3

#### **I- Structure moléculaire des canaux potassiques dépendants du voltage**

5

I-1 Sous-unités alpha ( $\alpha$ )

5

I-2 Sous-unités bêta ( $\beta$ )

9

I-3 Interaction entre sous-unités

13

#### **II- Courants potassiques cardiaques natifs. Propriétés ioniques et base moléculaire**

15

II-1 Critères d'association entre un canal cloné et un courant endogène cardiaque

15

II-2 Rôle des canaux potassiques dans le potentiel d'action cardiaque et

leur importance dans la fonction électrophysiologique	15
II-2-1 Courant transitoire sortant, $I_{to}$	16
II-2-1-1 Description et rôle physiologique	16
II-2-1-2 Propriétés ioniques	20
II-2-1-3 Base moléculaire	22
II-2-1-3-1 Sous-unités $\alpha$ impliquées dans la formation du courant $I_{to}$	22
II-2-1-3-2 Sous-unités $\beta$ impliquées dans la formation du courant $I_{to}$	23
II-2-2 Courant retardé sortant à rectification, $I_K$	26
II-2-2-1 Description et rôle physiologique	26
II-2-2-1-1 Courant retardé sortant à rectification, composante rapide ( $I_{Kr}$ )	26
II-2-2-1-2 Courant retardé sortant à rectification, composante lente ( $I_{Ks}$ )	28
II-2-2-1-3 Courant retardé sortant à rectification, composante ultra rapide ( $I_{Kur}$ )	30
II-2-2-2 Propriétés ioniques	30
II-2-2-3 Base moléculaire	32
II-2-2-3-1 Sous-unités $\alpha$ impliquées dans la formation du courant $I_K$	32
II-2-2-3-2 Sous-unités $\beta$ impliquées dans la formation du courant $I_K$ et leur influence sur les sous-unités $\alpha$ HERG et KvLQT1	36
II-2-3 Courant potassique sortant à rectification entrante, $I_{K1}$	39
II-2-3-1 Description et rôle physiologique	39
II-2-3-2 Base moléculaire	40
II-2-4 Canaux potassiques à rectification entrante couplés aux protéines G	41
II-2-4-1 Courant sensible à l'acétylcholine, $I_{KACh}$	41
II-2-4-1-1 Description et rôle physiologique	41
II-2-4-1-2 Base moléculaire	41

II-2-4-2 Courant sensible à l'ATP, $I_{KATP}$	42
II-2-4-2-1 Description et rôle physiologique	42
II-2-4-2-1 Base moléculaire	42
II-3 Mécanismes d'inactivation des canaux potassiques	44
II-3-1 Inactivation classique de « type N »	44
II-3-2 Inactivation classique de « type C »	46
II-3-3 Autres formes d'inactivation	48
II-3-4 Inactivation fonctionnelle des courants à rectification Entrante	50
II-4 Variations dans l'expression des canaux potassiques	50
II-4-1 Variations de l'expression selon la région et l'espèce	53
II-4-1-1 Le courant transitoire sortant, $I_{to}$	53
II-4-1-2 Le courant retardé sortant à rectification, $I_K$	54
II-4-1-3 Le courant sortant à rectification entrante, $I_{K1}$	58
II-4-1-4 Le courant potassique sensible à l'acétylcholine, $I_{KACh}$	59
II-4-1-5 Le courant potassique sensible à l'ATP, $I_{KATP}$	59
<b><u>III- Pathophysiologie des canaux potassiques cardiaques</u></b>	59
III-1 Syndrome du QT long	62
III-1-1 Syndrome du QT long impliquant des canaux potassiques	62
III-1-1-1 Syndrome LQT1	65
III-1-1-2 Syndrome LQT2	65
III-1-1-3 Syndrome LQT5	66
III-1-1-4 Syndrome LQT6	66
III-1-2 Syndrome du QT long n'impliquant pas de canaux potassiques	66
III-1-2-1 Syndrome LQT3	66
III-1-2-2 Syndrome LQT4	67
III-2 Syndrome de Brugada	67

III-3 Pathologie des canaux acquise	67
III-4 La fibrillation auriculaire	68
III-5 Sous régulation des canaux potassiques dans les pathologies Cardiaques	69
<b><u>IV- Pharmacologie des canaux potassiques cardiaques</u></b>	71
IV-1 Classification des agents antiarythmiques (selon Vaughan Williams)	71
IV-2 Actions des agents anti arythmiques sur les canaux potassiques	73
IV-2-1 Action des agents anti arythmiques sur $I_{to}$	74
IV-2-2 Action des agents anti arythmiques sur $I_{Kr}$	74
IV-2-3 Action des agents anti arythmiques sur $I_{Ks}$	76
IV-2-4 Action des agents anti arythmiques sur $I_{Kur}$	77
IV-2-5 Action des agents anti arythmiques sur $I_{KATP}$	78
<b>DEUXIÈME PARTIE: CONTRIBUTION ORIGINALE</b>	79
Hypothèses de travail et buts du projet de recherche	80
<b>CHAPITRE II: EFFECTS OF FLECAINIDE AND QUINIDINE ON KV4.2 CURRENTS: VOLTAGE DEPENDENCE AND ROLE OF S6 VALINES</b>	84
<b><u>I- Summary</u></b>	86
<b><u>II- Introduction</u></b>	87
<b><u>III- Methods</u></b>	88
III-1 Molecular biology	88
III-2 Cell culture and transfection	88
III-3 Solutions	89

III-4 Data acquisition and analysis	89
<b><u>IV- Results</u></b>	90
IV-1 Effects of flecainide and quinidine on Kv4.2 currents	90
IV-2 Concentration-dependent effects of flecainide and quinidine on Kv4.2 currents	91
IV-3 Voltage-dependent effects of flecainide and quinidine on Kv4.2 currents	92
<b><u>V- Discussion</u></b>	95
V-1 Comparison with previous studies of the effects of quinidine and flecainide on $I_{to}$ -like currents	95
V-2 Novel aspects and potential significance	96
<b><u>VI- Acknowledgments</u></b>	98
<b><u>VII- References</u></b>	99
<b><u>VIII- Tables</u></b>	102
<b><u>IX- Figures and figure legends</u></b>	103
<b>CHAPITRE III: THE N-TERMINAL RESTORES FAST INACTIVATION AND CONFERS KCHIP2 MODULATORY EFFECTS TO N-TERMINAL DELETED KV1.4 CHANNELS</b>	111
<b><u>I- Abstract</u></b>	113
<b><u>II- Introduction</u></b>	114

<b><u>III- Materials and methods</u></b>	115
III-1 Preparation of K <sup>+</sup> -channel subunit constructs	115
III-2 COS-7 cell maintenance and transfection	116
III-3 Recording of ionic currents	116
III-4 Data analysis	117
<b><u>IV- Results</u></b>	117
IV-1 Effects of N-terminal deletion	117
IV-2 Effects of valine mutations in the sixth transmembrane segment	117
IV-3 N-terminal of Kv4.2 restores fast inactivation to N-terminal-deleted Kv1.4.	118
IV-4 Effect of KChIP2 on Kv4.2	121
IV-5 Results of KChIP2 co-expression with Kv1.4	122
IV-6 KChIP2 effects on the N-termKv4.2/N-delKv1.4 chimeric protein	122
<b><u>V- Discussion</u></b>	122
V-1 Role of N-terminal in Kv4.2 and Kv1.4 inactivation	123
V-2 Reactivation properties of Kv4.2 and Kv1.4	124
V-3 Interactions with KChIP2	125
<b><u>VI- Acknowledgements</u></b>	127
<b><u>VII- References</u></b>	128
<b><u>VIII- Tables</u></b>	132
<b><u>IX- Figures and figure legends</u></b>	133

<b>CHAPITRE IV: CANINE VENTRICULAR KCNE2 EXPRESSION RESIDES PREDOMINANTLY IN PURKINJE FIBERS</b>	142
<b><u>I- Abstract</u></b>	144
<b><u>II- Introduction</u></b>	145
<b><u>III- Materials and methods</u></b>	145
III-1 Competitive RT-PCR and Real time PCR	145
III-2 Protein Isolation and Western Blot	147
III-3 Cell culture, immunocytochemistry	148
III-4 Statistical Analysis	148
<b><u>IV- Results</u></b>	149
IV-1 Expression of MiRP1 mRNA and Protein in Purkinje Fibers	149
<b><u>V- Discussion</u></b>	150
<b><u>VI- Acknowledgements</u></b>	151
<b><u>VII- References</u></b>	152
<b><u>VIII- Figures and figure legends</u></b>	155
<b>CHAPITRE V: THE KCNE2 GENE PRODUCT INTERACTS WITH KV3.4 SUBUNITS AND MODIFIES THEIR IONIC CURRENT CARRYING FUNCTION</b>	158

**I- Summary** 160

**II- Introduction** 160

**III- Experimental procedures** 161

III-1 cDNA preparation 161

III-2 Cell culture 162

III-3 Recording of ionic currents 162

III-4 Co- immunoprecipitation 163

III-5 Immunocytochemistry 163

III-6 Data analysis 164

**IV- Results** 164

IV-1 Kv3.4 and MiRP1 physically interact 164

IV-2 Kv3.4 and MiRP1 co-localize in mammalian cells 165

IV-3 MiRP1 affects Kv3.4 current carrying properties 165

**V- Discussion** 167

**VI- Acknowledgements** 169

**VII- References** 170

**VIII- Figures and figure legends** 173

**CHAPITRE VI: KvLQT1 MODULATES THE DISTRIBUTION AND BIOPHYSICAL PROPERTIES OF HERG: A NOVEL ALPHA-SUBUNIT INTERACTION BETWEEN DELAYED-RECTIFIER CURRENTS** 180



<b><u>I- Summary</u></b>	182
<b><u>II- Introduction</u></b>	183
<b><u>III- Experimental procedures</u></b>	184
III-1 Cell Culture	184
III-2 Data Acquisition and Analysis	184
III-3 Tissue and Cardiomyocyte Isolation	185
III-4 Immunoprecipitation	185
III-5 Immunofluorescence and Confocal Microscopy	186
III-6 Creation of GST-C-terminal HERG Fusion Protein	187
III-7 Protein Purification and GST Pulldown	187
<b><u>IV- Results</u></b>	188
IV-1 Electrophysiological Evidence for HERG-KvLQT1 Interaction	188
IV-2 Effect of HERG Co-expression on Current Carried by KvLQT1/minK	189
IV-3 Co-localization of HERG and KvLQT1	189
IV-4 Co-immunoprecipitation of HERG and KvLQT1	191
IV-5 GST Pulldown of KvLQT1	192
<b><u>V- Discussion</u></b>	193
V-1 Physiological Role of $I_k$ and Subunit Interactions	193
<b><u>VI- Acknowledgments</u></b>	196
<b><u>VII- References</u></b>	197
<b><u>VIII- Figures and figure legends</u></b>	201

<b>CHAPITRE VII : DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION</b>	213
<b><u>I- Résumé des nouveaux éléments mis en lumière dans cette thèse et signification des résultats dans le contexte de la littérature</u></b>	214
I-1 Inactivation de Kv4.2	215
I-2 Effets de la quinidine et de la flécainide sur Kv4.2	217
I-3 Modulation de Kv4.2 par KChIP2	218
I-4 Modulation de Kv3.4 par MiRP1	219
I-5 Modulation de HERG par KvLQT1	221
<b><u>II- Orientations futures</u></b>	223
<b><u>III- Conclusion</u></b>	225
<b>CHAPITRE VIII : RÉFÉRENCES</b>	226

# LISTE DES TABLEAUX

## Chapitre I

Tableau 1:	Classification des différents types de canaux potassiques, gènes les encodant, nomenclature et localisation tissulaire.	11
Tableau 2:	Classification des différents canaux potassiques impliqués dans le potentiel d'action cardiaque.	43
Tableau 3:	Composition moléculaire et propriétés du courant transitoire sortant dans différentes espèces.	56
Tableau 4:	Syndromes génétiques d'arythmie.	63
Tableau 5:	Spécificité d'action des agents antiarythmiques sur les canaux potassiques.	76

.

## Chapitre II

Table 1:	Inactivation kinetics and voltage dependence of the activation And inactivation on Kv4.2WT and N-del, V[402-404]I and N-del/V[402-404]I mutants.	102
----------	--	-----

## Chapitre III

Table 1:	Effect of KChIP2 on current density.	132
----------	--------------------------------------	-----

# LISTE DES FIGURES

## Chapitre I

Figure 1:	Structure moléculaire des différentes sous-unités d'un canal potassique.	8
Figure 2:	Potentiel d'action cardiaque montrant les différents canaux potassiques impliqués dans la repolarisation et le maintien du potentiel de repos ainsi que les sous-unités $\alpha$ et $\beta$ les constituant.	16
Figure 3:	Enregistrement du courant transitoire sortant $I_{to}$ .	19
Figure 4:	Hétérogénéité dans la forme de potentiels d'action enregistrés dans les différentes couches ventriculaires. Implication du courant transitoire sortant $I_{to}$ .	21
Figure 5:	Effets de KChIP2 sur Kv4.2.	25
Figure 6:	États de transition expliquant le fonctionnement du canal $I_{Kr}$ .	28
Figure 7:	KvLQT1 et minK s'assemblent pour former le courant endogène $I_{Ks}$ .	34
Figure 8:	Courants potassiques retardés à rectification enregistrés à partir de myocytes cardiaques et leurs sous-unités clonées respectives.	38
Figure 9:	Description schématique du mécanisme d'inactivation de type N.	46
Figure 10:	Mécanisme d'inactivation simplifié des sous-unités Kv4.	49
Figure 11:	Variabilité du potentiel d'action selon la région.	52
Figure 12:	L'activité électrique responsable du battement cardiaque.	60
Figure 13:	Relation entre un potentiel d'action cardiaque avec ses courants sous-jacents et un électrocardiogramme.	61

## Chapitre II:

Figure 1:	Effects of flecainide on Kv4.2 currents.	103
Figure 2:	Effects of quinidine on Kv4.2 currents.	104
Figure 3:	Concentration-dependent effects of flecainide and	

	quinidine on Kv4.2 currents upon pulsing to +50 mV.	105
Figure 4:	Effects of flecainide (10 $\mu$ M) and quinidine (10 $\mu$ M) on Kv4.2WT.	106
Figure 5:	Effects of flecainide (10 $\mu$ M) and quinidine (10 $\mu$ M) on voltage-dependent N-del current activation and inactivation.	108
Figure 6:	Effects of flecainide (10 $\mu$ M) and quinidine (10 $\mu$ M) on voltage-dependent V[402-404]I current activation and inactivation.	109
Figure 7:	Effects of flecainide (10 $\mu$ M) and quinidine (10 $\mu$ M) on voltage-dependent N-del/V[402-404]I current activation and inactivation.	110

### Chapitre III

Figure 1:	The effects of N-terminal deletion and valine mutations on Kv4.2 current.	133
Figure 2:	The N-terminus of Kv4.2 can restore rapid inactivation to inactivation-deficient N-terminal deleted Kv1.4-subunit (N-delKv1.4) currents.	134
Figure 3:	Voltage dependence of steady state inactivation of the chimera, compared to wild type Kv4.2 and Kv1.4.	135
Figure 4:	Recovery from inactivation (reactivation) of currents resulting from expression of the chimera compared to wild type Kv4.2 and Kv1.4.	136
Figure 5:	Inward currents carried by Kv1.4, Kv4.2 and the chimera upon repolarization to -50 mV after 5 and 65 ms depolarizations to +50 mV in 130 mM external [K <sup>+</sup> ] at room temperature.	137
Figure 6:	Effect of KChIP2 on Kv4.2 current properties.	138
Figure 7:	Effect of KChIP2 on double-valine mutated Kv4.2 current properties.	139
Figure 8:	Effect of KChIP2 on Kv1.4 current properties.	140
Figure 9:	Effect of KChIP2 on Kv4.2 N-terminal/N-terminal	

deleted Kv1.4 chimera current properties. 141

## Chapitre IV

- Figure 1: Ethidium bromide-stained gels with products from competitive RT-PCR reactions using dog ventricular muscle (VM), Purkinje tissue (PF), and sinoatrial node (SAN). 155
- Figure 2: MiRP1 protein expression in Purkinje fibers versus ventricle. 156
- Figure “online”: Immunofluorescent (top) and corresponding dark-field (bottom) images of CHO cells. 157

## Chapitre V

- Figure 1: Co-immunoprecipitation of Kv3.4 and MiRP1. 173
- Figure 2: Co-localization of Kv3.4 and MiRP1 in CHO cells. 174
- Figure 3: Representative currents recorded from CHO cells transfected with Kv3.4 alone or Kv3.4+MiRP1. 175
- Figure 4: Voltage dependence of activation and inactivation and recovery from inactivation. 177
- Figure 5: Concentration-response data (mean±SEM) for TEA effects on Kv3.4 alone and Kv3.4+MiRP1. 179

## Chapitre VI

- Figure 1: Electrophysiological evidence for HERG-KvLQT1 interaction. 201
- Figure 2: Co-transfection of KvLQT1 increased HERG-current ( $I_{\text{HERG}}$ ) densities. 202
- Figure 3: Effect of HERG co-expression on current carried by KvLQT1/minK. 203
- Figure 4: Deconvoluted immunofluorescent images of a canine ventricular myocyte double-labeled with anti-HERG and anti-KvLQT1 antibodies. 205

Figure 5:	Deconvoluted immunofluorescent images of CHO cells expressing HERG or/and KvLQT1.	207
Figure 6:	Western blots for HERG and KvLQT1 proteins in CHO cells, with and without KvLQT1 pull down.	209
Figure 7:	Representative results from co-immunoprecipitation of HERG and KvLQT1 in canine left ventricular crude membrane extracts.	210
Figure 8:	Involvement of the HERG C-terminal in KvLQT1 interaction.	211

## LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS

ADN: Acide désoxyribonucléique

ARN: Acide ribonucléique

ATP: Adénosine tri phosphate

AVP: Arythmie ventriculaire polymorphique

C : Closed

CAST: Cardiac Arrhythmia Suppression Trial

CHO: Chinese Hamster Ovary cells

CTX: Charybdotoxin

DAD: delayed after depolarization

DTX: dendrotoxin

Endo: Endocarde

Epi: Épicarde

ERG: Ether a-go-go gene

4-AP: 4- Aminopyridine

FA: Fibrillation auriculaire

FV: Fibrillation Ventriculaire

GFP: Green fluorescent protein

GST: Gluthation S-transferase

HEK: Human Embryonic Kidney Cells

I: Inactivated

$I_K$  : Courant potassique retardé sortant à rectification

$I_{K_{ACh}}$ : Courant potassique sensible à l'acétylcholine

$I_{K_{ATP}}$  : Courant potassique sensible à l'ATP

$I_{K1}$ : Courant potassique sortant à rectification entrante

$I_{Kr}$  : Courant potassique retardé sortant à rectification, composante rapide

$I_{Ks}$  : Courant potassique retardé sortant à rectification, composante lente

$I_{to}$ : Courant transitoire sortant

KChIP2: Potassium Channel Interacting Protein 2

KDa: Kilo Dalton



Kir: K-selective inward rectifiers  
Kv: Potassium channel voltage dependent  
MinK: Minimal potassium channel  
MiRP1: MinK Related Peptide 1  
O: Open  
O: Oreillette  
OD: Oreillette Droite  
OG: Oreillette Gauche  
pA : picoampère  
PCR: Polymerase Chain Reaction  
pS : picosiemens  
PVG: Paroi Ventricule Gauche  
RT: Reverse Transcription  
SJLN: Syndrome de Jervell-Lange-Nielsen  
SQTL : Syndrome du QT long  
SRW: Syndrome de Romano Ward  
SUR: Récepteur aux sulfonurés  
SWORD: Survival With Oral D-Sotalol  
TEA: Tetraethylammonium  
TdP: Torsade de pointe  
TV: Tachycardie Ventriculaire  
V: Ventricule  
VD: Ventricule Droit  
VG : Ventricule gauche  
Vmax: Vitesse de la pente maximale de la phase 0

## REMERCIEMENTS

Je désire remercier mon directeur de recherche, le Dr Stanley Nattel pour son soutien inconditionnel. Ma gratitude envers lui est à la dimension de ses qualités humaines et scientifiques. Je lui suis reconnaissant à la fois pour un succès dont je lui suis redevable et pour l'enrichissement intérieur qu'il m'a inculqué.

Par ailleurs, j'aimerais adresser mes plus sincères remerciements au Dr Zhiguo Wang qui m'a enseigné les techniques de base de biologie moléculaire et qui m'a accompagné à mes débuts dans le laboratoire.

Je voudrais également remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin ont contribué au succès de mes travaux. Je pense ainsi à mes proches collaborateurs, Dr Gernot Schram, Dr Joachim Ehrlich, Dr Ricardo Caballero, Stephen Zicha, Daniel Herrera, Peter Melnyk, Dr Wei Han, Dr Lixia Yue et aux techniciennes Evelyn Landry, Chantal St Cyr, Chantal Maltais, Nathalie L'Heureux, XiaoFan Yang sans qui le travail de laboratoire aurait été plus éprouvant.

Un merci particulier à Nathalie Ethier, au Dr Manjula Weerapura et au Dr Terry Hébert qui, par leur compétence ont vivement contribué à l'amélioration de mes habilités techniques.

Je voudrais aussi manifesté ma gratitude envers France Thériault, Diane Campeau et Luce Bégin pour leur aide très précieuse dans la conception des manuscrits et autre travail de secrétariat.

Finalement, c'est avec émotion que j'adresse ma plus profonde reconnaissance à mon épouse, Nathalie, qui m'a toujours soutenu aussi bien dans les périodes de succès que dans les moments de frustration. Sa présence à mes côtés sera toujours d'un réconfort sans partage.

À mes parents, sans qui cette belle aventure ne se serait jamais réalisée. Je leur serais toujours gratifiant pour la confiance qu'ils m'ont accordée ainsi que pour leur soutien tant financier que moral.

À ma sœur, Valérie et au reste de ma famille et amis qui ont toujours cru en moi.

## CONTRIBUTION DES AUTEURS

1- Caballero R.,\* **Pourrier M.**,\* Schram G., Delpon E., Tamargo J., Nattel S: A critical role for S6 valines in the pharmacological properties of transient outward current ( $I_{to}$ ) carried by Kv4.2 subunits *Br. J.Pharmacol* 2003; 138: 1475-1484. (\*Indique que les deux auteurs ont contribué de façon équivalente à cet article).

Dans cette étude, j'ai effectué la partie biologie moléculaire qui consistait en la conceptualisation et la construction de 3 protéines Kv4.2 mutées ainsi que la caractérisation fonctionnelle des protéines mutées et certains enregistrements de courant pour la partie pharmacologique par la technique du Patch clamp. J'ai également contribué à l'écriture du manuscrit. Dr Ricardo Caballero a participé à l'enregistrement des courants à partir des cellules COS-7 transfectées avec les différents ADN complémentaires. Il a également effectué la caractérisation pharmacologique des différents mutants. Dr Gernot Schram a contribué aux travaux de biologie moléculaire. Drs Delpon et Tamargo ont contribué à l'analyse scientifique des résultats. Dr Nattel a eu l'idée originale de ces travaux et a produit la version finale de cet article.

2- **Pourrier M.**, Herrera D, Caballero R., Schram G., Wang Z., Nattel S: The Kv4.2 N-terminal restores fast inactivation and confers KChIP2 modulatory effects to N-terminal deleted Kv1.4 channels. *Pflügers Arch.* (en revision)

J'ai dans le cadre de cet article, réalisé l'ensemble des expériences (biologie moléculaire et électrophysiologie), analysé les résultats et préparé les figures. J'ai rédigé l'article sous la supervision de mon directeur de recherche. Daniel Herrera, Dr Caballero et Dr Schram ont contribué aux expériences de biologie moléculaire. Dr Wang a assuré la co-direction de ces travaux et Dr Nattel a eu l'idée originale et produit la version finale de cet article.

**3- Pourrier M.,\* Zicha S., Ehrlich J., Han W., Nattel S.** Canine Ventricular KCNE2 Expression Resides Predominantly in Purkinje Fiber Tissue. *Circ res.* 2003 ; 93 : 189-191. (\*Indique que les deux auteurs ont contribué de façon équivalente à cet article).

Pour cet article, j'ai réalisé des expériences de Western blot, de PCR en temps réel. J'ai écrit le manuscrit et préparé les figures en association avec mon directeur de recherche et analysé les données en association avec Stephen Zicha. Stephen Zicha a également effectué les PCR compétitifs et certaines expériences de Western Blot. Dr Joachim Ehrlich a effectué les expériences d'immunohistochimie. Dr Nattel a eu l'idée originale de ces travaux et a produit la version finale de cet article.

**4- Pourrier M., Ehrlich J., Zicha S., Schram G., Wang Z., Nattel S:** The KCNE2 gene product interacts with Kv3.4 subunits and modifies their ionic current carrying function (en préparation)

J'ai dans le cadre de cet article, réalisé l'ensemble des expériences, analysé les résultats et préparé les figures. J'ai rédigé l'article sous la supervision de mon directeur de recherche. Drs Ehrlich et Schram ont contribué aux expériences de biologie moléculaire tandis que Stephen Zicha a contribué aux expériences de biologie cellulaire. Dr Nattel a eu l'idée originale de ces travaux et a produit la version finale de cet article

**5- Ehrlich J.,\* Pourrier M.,\* Weerapura M., Hebert T., Nattel S:** KvLQT1 modulates the expression and properties of HERG: A novel alpha-subunit interaction between delayed-rectifier currents. *JBC.* 2004 ; 279 (2) : 1233-1241. (\*Indique que les deux auteurs ont contribué de façon équivalente à cet article).

Mon travail consistait à démontrer l'interaction moléculaire entre les deux sous-unités  $\alpha$  HERG et KvLQT1. J'ai pour ce faire effectué toute la partie moléculaire de cette étude (consistant en la transfection des cellules de mammifères CHO, co-immunoprécipitation, western blot). J'ai également participé à la rédaction du manuscrit et à la production des figures en association avec les Drs Ehrlich et

Nattel. Dr Ehrlich a caractérisé l'interaction entre les deux sous-unités au niveau électrophysiologique et a effectué les expériences d'immunocytochimie. Dr Nattel a eu l'idée originale de ces travaux et a produit la version finale de cet article.

Pour le savant, croire la science achevée est toujours une illusion aussi complète qui  
le serait pour l'historien de croire l'histoire terminée.

*Louis de Broglie, 1947*

*À mes enfants, Mathis et Ethan  
À mon épouse, Nathalie  
À mes parents, Monique et André*

**PREMIÈRE PARTIE:  
INTRODUCTION ET REVUE DE  
LA LITTÉRATURE**

**CHAPITRE I : LES CANAUX POTASSIQUES  
DANS LA REPOLARISATION DES CELLULES  
CARDIAQUES**



Les différents mouvements ioniques qui s'effectuent au niveau de la membrane des cellules cardiaques sont responsables de potentiels électriques qui permettent l'activation du cœur. Les ions voyagent d'un côté à l'autre des membranes lipophiles par l'intermédiaire de canaux ancrés dans ces membranes. L'ouverture et la fermeture de ces canaux sont régulées par le potentiel membranaire (dépendance au voltage) ainsi que par le temps écoulé suite à un changement de potentiel (dépendance au temps) (Katz, 1993). L'activité électrique de toute cellule excitable est due à son environnement ionique: Concentration plus importante d'ions sodiques dans les fluides extracellulaires que dans le milieu intracellulaire, et concentration plus élevée d'ions potassiques dans le cytoplasme que dans le milieu extracellulaire. La membrane cellulaire sépare ces deux compartiments et les gradients ioniques ainsi établis sont maintenus par différentes pompes et canaux.

Aussi, le potentiel de repos des cellules du myocarde est directement relié au gradient électrochimique des ions potassiques à travers la membrane. Ce gradient est maintenu par la pompe ATPase  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  qui permet la sortie de 3 ions sodiques pour l'entrée de 2 ions potassiques et maintient donc l'électronégativité du milieu intracellulaire (Katz, 1992). Du fait que certains canaux potassiques se trouvent à l'état ouvert à des potentiels négatifs, la membrane plasmique est perméable aux ions potassium lorsque la cellule est au repos. Les ions potassium ont donc tendance à quitter le milieu intracellulaire, suivant leur gradient de concentration (du plus concentré vers le moins concentré). Cependant, la sortie d'ions potassium qui portent des charges positives crée un gradient électrique contraire au gradient électrochimique. Ceci étant la conséquence du nombre important d'anions présents dans le cytosol qui est donc chargé négativement. Lorsque la force électrique attirant les ions potassiques à l'intérieur de la cellule est égale et opposée à la force chimique ayant tendance à exclure les ions potassique de la cellule, toutes les forces sont alors balancées et le mouvement d'ions potassique s'arrête. Le potentiel membranaire auquel ce mouvement d'ion s'arrête est connu sous le nom de potentiel d'équilibre du potassium. Il est donné par l'équation de Nernst et se situe aux alentours de  $-95\text{mV}$  (Hille, 2001).

Les changements de potentiels membranaires sont donc rendus possible par le passage des ions à travers les canaux par diffusion passive. Les canaux ioniques

permettent le passage des ions dans le sens qui leur est dicté par le gradient électrochimique de chaque ion. Par conséquent, l'ouverture des canaux sodiques permet le passage des ions sodiques du milieu extracellulaire vers le cytoplasme, rendant l'intérieur de la cellule plus positif alors que les canaux potassiques permettent la sortie des ions potassium du cytoplasme vers le milieu extracellulaire, ramenant la cellule à un potentiel plus négatif.

L'ouverture des canaux potassiques a donc pour effet de repolariser les cellules cardiaques suite à leur dépolarisation par l'ouverture des canaux sodiques ou calciques.

Les canaux potassiques appartiennent à une famille de protéines membranaires ubiquitaires qui jouent un rôle important dans de nombreux procédés physiologiques tels que la régulation du rythme cardiaque, la contraction musculaire, la relâche de neurotransmetteurs, l'excitabilité neuronal, la sécrétion d'insuline, la régulation du volume cellulaire et la prolifération cellulaire (Wickenden, 2002). Les canaux potassiques ont évolué différemment au cours de l'évolution afin de pouvoir remplir leurs rôles physiologiques variés. Certains d'entre eux sont dépendants du voltage (Kv), soit qu'ils sont activés par des changements de potentiels membranaires. Ces canaux agissent pour contrecarrer l'effet des courants dépolarisants et sont donc nécessaires pour repolariser la cellule. Une autre classe de canaux potassiques, les canaux potassiques à rectification entrante sont principalement conducteurs à des potentiels hyperpolarisants. Ils sont bloqués par des ions divalents tels que le magnésium à des potentiels plus positifs. Ces canaux sont donc importants dans le maintien du potentiel de repos. D'autres canaux potassiques à rectification entrante sont régulés par des niveaux intracellulaires d'ATP ou par couplage aux protéines G (Wickenden, 2002).

Afin de comprendre les fonctions moléculaires de différentes sous-unités qui constituent les canaux potassiques cardiaques, il est important d'introduire cette thèse par des notions structurales et physiologiques fondamentales.

Dans la première partie, nous parlerons tout d'abord de la structure des différents canaux potassiques cardiaques. Comment leur structure permet-elle d'expliquer leur fonction ?

Par la suite, nous décrirons le rôle des différents canaux potassiques dans le potentiel d'action cardiaque ainsi que leur propriétés ioniques et moléculaires.

Les canaux potassiques étudiés dans cette thèse ont tous une propriété en commun : Ils s'inactivent. L'inactivation est une propriété commune à la plupart des canaux potassiques. Elle est plus ou moins rapide et son importance physiologique est capitale puisqu'elle permet de contrôler le temps pendant lequel le canal se trouve dans un état conducteur. Les différents types d'inactivation et leur mécanisme d'action seront décrits afin de mieux comprendre leur importance dans l'électrophysiologie cardiaque.

Les sous-unités formant les canaux potassiques cardiaques sont liées à différentes pathologies qui seront décrites.

Enfin, les sous-unités potassiques cardiaques ont des propriétés pharmacologiques distinctes qu'il est important de comprendre afin d'évaluer leur implication thérapeutique. Ces propriétés seront présentées dans la dernière partie de la présente introduction.

## **I- Structure moléculaire des canaux potassiques dépendants du voltage**

### **I-1 Sous-unités alpha ( $\alpha$ )**

L'étude structurale du canal potassique bactérien KcsA a servi de précurseur dans la détermination de la structure moléculaire des canaux ioniques cardiaques. Les canaux ioniques sont des protéines ancrées dans la membrane cytoplasmique. Ils possèdent trois propriétés essentielles qui sont les suivantes :

- 1- Ils possèdent un pore central qui a pour fonction de laisser passer les ions selon leur gradient électrochimique.
- 2- Un filtre de sélectivité qui dicte quel ion est autorisé à passer à travers le canal et,
- 3- Un système de fermeture et d'ouverture du canal qui permet le contrôle de la perméabilité du canal pour son ion (Snyders, 1999).

Les canaux potassiques sont divisés en famille avec des groupes composés de 6 (famille des canaux potassiques dépendants du voltage Kv1 à 9, KvLQT1 et ERG), 4 (famille des canaux potassiques à deux pores TWIK, TREK, TASK, TRAAK) ou 2

(famille des canaux potassiques à rectification entrante Kir2, Kir3.1/3.4, Kir6.2/SUR) segments transmembranaires (tableau 1, figure 1). Les canaux potassiques dépendants du voltage peuvent être formé par l'association de 4 sous-unités identiques (homotétramères) ou différentes (hétérotétramères) (MacKinnon, 1991). Seul des sous-unités appartenant à la même famille sont capables de s'associer (par exemple, une sous-unité Kv1.x ne peut s'associer qu'avec une autre sous-unité Kv1.x et non avec une sous-unité Kv2.x) (Isacoff *et al.*, 1990). Chaque sous-unité  $\alpha$  contient un senseur de voltage, et contribue à la partie centrale du pore du canal. Ce pore est rempli d'eau et sélectif pour certains ions (MacKinnon, 1991). Chaque sous-unité  $\alpha$  est formée de 6 hélices  $\alpha$  transmembranaires et les extrémités amino- et carboxy- terminales sont intracellulaires (figure 1A). La famille des canaux potassiques est formée d'au moins 22 gènes différents chez les mammifères. S'ajoute à cela des canaux résultant de l'épissage alternatif et de l'hétéromultimérisation (Yellen, 2002). Le segment transmembranaire S4 est le senseur de voltage. Cette structure permet un changement de conformation du canal en réponse à une variation du potentiel membranaire. Ce changement de conformation permet l'ouverture du canal et par conséquent, le passage des ions à travers la membrane. La principale caractéristique du segment S4 est sa composition en résidus amino acides chargés positivement (lysine ou arginine). Une charge positive est retrouvée toutes les trois positions pour un total d'environ 6 charges positives par segment (Shieh *et al.*, 2000)

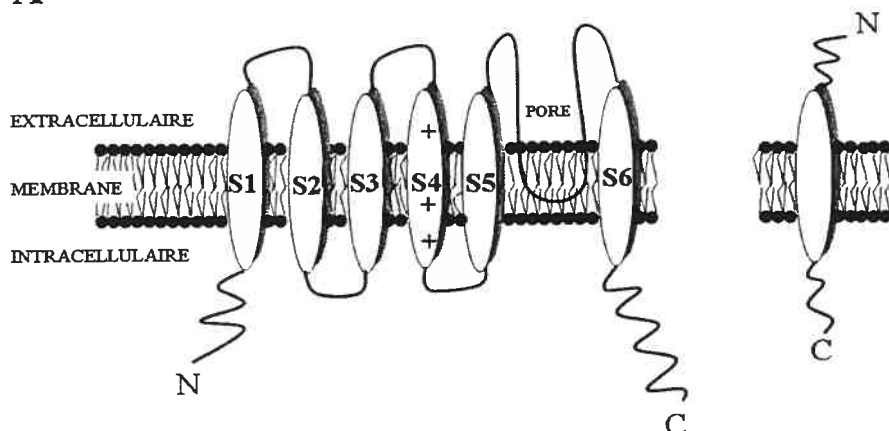
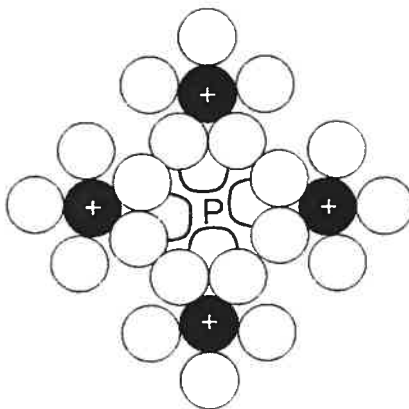
La boucle P située entre les segments transmembranaires 5 et 6 est constituée d'une vingtaine d'acides aminés. Elle pénètre dans la membrane et constitue la partie externe du pore du canal. La sélectivité du canal potassique est attribuée à une séquence spécifique retrouvée dans le pore, soit GXG où X peut être Y (tyrosine), F (phenylalanine) ou L (leucine) (Heginbotham *et al.*, 1994). Les résidus adjacents à cette séquence sont aussi conservés parmi la superfamille des canaux potassiques. Les canaux potassiques sont très sélectifs. La présence de 4 boucles P (S5-S6) créées par un homo- ou un hétérotétramère est nécessaire pour former le pore d'un canal potassique fonctionnel (MacKinnon, 1991) (figure 1B). Cette sélectivité est particulièrement importante pour la fonction biologique du canal (Yellen, 2002). La partie externe du pore constituée d'une partie de la boucle P, et de résidus adjacents

des segments S5 et S6 forme un site de liaison pour des agents pharmacologiques tels que des toxines ou des bloqueurs de canaux potassiques (Goldstein & Miller, 1993; MacKinnon & Miller, 1988; MacKinnon *et al.*, 1990; Pascual *et al.*, 1995). Par ailleurs, d'autres agents pharmacologiques tels que le 4 aminopyridine (4-AP), le tetraethyl ammonium (TEA) et la quinidine se lient à des résidus des segments S5 et S6 qui font face à la partie intracellulaire du pore (Choi *et al.*, 1993; Lopez *et al.*, 1994; Lopez *et al.*, 1994; Shieh & Kirsch, 1994; Yeola *et al.*, 1996).

Il est également suggéré que le lien entre les segments S5 et S6 servent de récepteur à la balle responsable de l'inactivation de certains canaux potassiques (Isacoff *et al.*, 1991). Les canaux potassiques sortants à rectification entrante contiennent 2 segments transmembranaires et un pore central (figure 1C, gauche). La répétition de ce motif est à la base de la structure des canaux à quatre domaines transmembranaires et à deux pores (figure 1C, droite).

**A**

Six domaines transmembranaires, un pore.

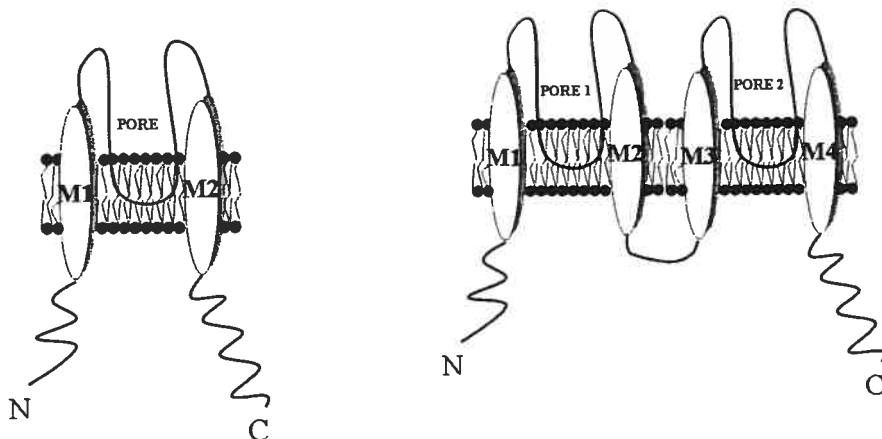
*Sous-unité α (Kv1-9, ERG, KvLQT1)**Sous-unité β (minK, MiRP1),***B**

*Assemblage des 4 sous-unités α pour former un canal fonctionnel avec un pore (P) central.*

**C**

Deux domaines transmembranaires, un pore

Quatre domaines transmembranaires, 2 pores



**Figure 1** : Structure moléculaire des différentes sous-unités d'un canal potassique.

A, sous-unités  $\alpha$  possédant 6 segments transmembranaires (S1-S6) (gauche) pouvant s'associer avec des sous-unités  $\beta$  (droite) pour former les canaux sensibles au voltage. B, l'association de quatre sous-unités  $\alpha$  constitue un homo ou un hétéro multimère avec un pore central. C, sous-unités  $\alpha$  avec deux segments transmembranaires (M1 et M2) (gauche) portant les courants à rectification entrante et correspondant aux segments S5 et S6 des sous-unités  $\alpha$  à six segments transmembranaires représentées en A. La répétition de cette structure produit les canaux à quatre domaines transmembranaires et deux pores (droite) (modifiée à partir de Snyders *et al.*, 1999).

## I-2 Sous-unités bêta ( $\beta$ )

L'expression des sous-unités  $\alpha$  dans des systèmes d'expression hétérologues a permis de reproduire bon nombre de propriétés ioniques de canaux potassiques endogènes. Cependant, il apparaît que ces sous-unités seules ne peuvent expliquer l'ensemble des propriétés ioniques observées chez les courants endogènes. Ainsi, un certain nombre de sous-unités  $\beta$  a été découvert et cloné, mettant la lumière sur certaines interrogations.

Alors que les sous-unités  $\alpha$  comprennent le pore du canal, les sous-unités  $\beta$  ont pour fonction principale de moduler les propriétés ioniques et pharmacologiques des sous-unités  $\alpha$  ainsi que leur transport à la membrane et leur distribution tissulaire (Pourrier *et al.*, 2003).

L'interaction entre les deux sous-unités peut être dynamique et/ou peut être modulée par d'autres protéines du cytosquelette notamment les sous-unités  $\beta$  cytosoliques (Pourrier *et al.*, 2003).

Au niveau cardiaque, il existe principalement trois sous-unités  $\beta$ , soit minK, MiRP1 et KChIP2. Alors que minK et MiRP1 sont des protéines membranaires à un seul segment transmembranaire (figure 1A), KChIP2 est une protéine cytoplasmique. Il existe une autre famille de sous-unité  $\beta$  qui s'associe aux sous-unités  $\alpha$  Kv et qui affectent leur propriété d'inactivation. Il s'agit des sous-unités Kv $\beta$ . Cependant, leur

importance physiologique au niveau cardiaque n'est pas très claire et pour cette raison, elles ne seront pas décrites dans cette thèse.

MinK, encodé par le gène KCNE1, est une protéine constituée de 130 acides aminés et possède une séquence qui est relativement bien conservée selon les espèces (il existe par exemple 92% d'identité entre minK chez le rat et la souris (Honore *et al.*, 1991) et 76% entre minK chez l'humain et le rat (Murai, id 292)).

MiRP1 (MinK Related Peptide 1) est encodé par le gène KCNE2. Il contient 123 acides aminés. Comme minK, MiRP1 est constitué d'un segment transmembranaire avec extrémité N-terminale du côté extracellulaire et C-terminale du côté intracellulaire (figure 1). MiRP1 et minK partage peu d'identité. Par exemple chez le rat, MiRP1 et minK n'ont que 27% d'identité (Abbott *et al.*, 1999).

KChIP2 (Potassium Channel Interacting Protein 2) est une protéine cytoplasmique fortement exprimée dans le cœur (An *et al.*, 2000) qui possède une extrémité C-terminale de 185 acides aminés avec 4 sites de liaison pour le calcium (EF) (An *et al.*, 2000). Le gène KCNIP2 codant pour KChIP2 contient 10 exons. Au moins 3 isoformes différents de KChIP2 sont exprimés dans le cœur soit un de 220 acides aminés, un de 252 acides aminés et un de 270 acides aminés (Bahring *et al.*, 2001b; Decher *et al.*, 2001; Deschenes *et al.*, 2002; Ohya *et al.*, 2001; Takimoto *et al.*, 2002). Plusieurs variants ont été reporté dans différentes espèces (rat, furet, souris et humain) avec des séquences similaires.



Type	Gène	Nomenclature	Expression tissulaire
Canaux Kv ( <i>Shaker</i> )	KCNA1	Kv1.1	Neurones, cœur, rétine, îlots pancréatiques
	KCNA2	Kv1.2	Cerveau, cœur, îlots pancréatiques
	KCNA3	Kv1.3	Lymphocytes, cerveau, poumons, thymus, rate
	KCNA4	Kv1.4	Cerveau, cœur, îlots pancréatiques
	KCNA5	Kv1.5	Cerveau, cœur, reins, poumons, muscle squelettique
	KCNA6	Kv1.6	Cerveau
	KCNA7	Kv1.7	Cœur, îlots pancréatiques, muscle squelettique
Sous-unités $\beta$ des canaux Kv	KCNAB1	Kv $\beta$ 1	Cerveau (Kv $\beta$ 1.1) Cœur (Kv $\beta$ 1.2)
	KCNAB2	Kv $\beta$ 2	Cerveau, coeur
	KCNAB3	Kv $\beta$ 3	Cerveau
<i>Shab</i>	KCNB1	Kv2.1/2.2	Cerveau, cœur, reins, muscle squelettique, rétine.
<i>Shaw</i>	KCNC1	Kv3.1	Cerveau, muscle, lymphocyte
	KCNC2	Kv3.2	Cerveau
	KCNC3	Kv3.3	Cerveau, foie
	KCNC4	Kv3.4	Cerveau, muscle squelettique, coeur
<i>Shal</i>	KCND1	Kv4.1	Cœur, cerveau, foie, reins, poumon, placenta, pancréas
	KCND2	Kv4.2	Cerveau, cœur
	KCND3	Kv4.3	Cerveau, coeur

Ether-a-go-go	KCNH1	EAG	Cerveau
Human EAG	KCNH2	hERG	Cerveau, cœur
	KCNH3	BEC1	Cerveau
	KCNH4	BEC2	Cerveau
MinK	KCNE1	MinK	Reins, utérus, cœur, rétine, oreille interne
	KCNE2	MiRP1	Cœur, cerveau, estomac
	KCNE3	MiRP2	Petit intestin, colon, reins, estomac, muscle squelettique
	KCNE4	MiRP3	Utérus, poumons, petit intestin, colon, reins
KvLQT1	KCNQ1	KvLQT1	Cœur, oreille interne, reins, poumon, placenta, colon
	KCNQ2	KvLQT2	Cerveau, neurones
	KCNQ3	KvLQT3	Cerveau, neurones
	KCNQ4	KvLQT4	Oreille interne, voie auditrice centrale
	KCNQ5	KvLQT5	Cerveau, muscle squelettique
Canaux à rectification entrante	KCNJ1	Kir1.1-1.3	Reins, îlots pancréatiques
	KCNJ2	Kir2.1	Cœur, cerveau, muscle lisse et squelettique, poumons, placenta, reins
	KCNJ3	Kir3.1	Cœur
	KCNJ4	Kir2.3	Cœur, cerveau, muscle squelettique
	KCNJ5	Kir3.4	Cœur, pancréas
	KCNJ6	Kir3.2	Îlots pancréatiques, cerebellum

	KCNJ9	Kir3.3	Cerveau
	KCNJ11	Kir6.2	Variée
	KCNJ12	Kir2.2	Oreillette, ventricule
	KCNJ14	Kir2.4	Cerveau, rétine
Récepteur au sulfonylurée	SUR1	Récepteur au sulfonylurée 1	Pancréas, neurones, muscle squelettique
	SUR2	Récepteur au sulfonylurée 2A	Cœur, muscle squelettique
Canaux à 2 pores	KCNK1	TWIK1	Cerveau, reins, cœur
	KCNK2	TREK	Cerveau, poumons
	KCNK3	TASK	Cœur, cerveau, pancréas, placenta

**Tableau 1:** Classification des différents types de canaux potassiques, gènes les encodant, nomenclature et localisation tissulaire (modifié à partir de Shieh *et al.*, 2000).

### I-3 Interaction entre sous-unités

Les domaines précédents le segment transmembranaire S1 sont impliqués dans l'assemblage entre sous-unités.

Dans la famille Kv1, une séquence spécifique retrouvée dans l'extrémité N-terminale est importante pour l'interaction entre sous-unité de la même famille (Li *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 1996). Les 130 premiers acides aminés de la partie N-terminale sont nécessaires à la formation d'homotétramères. La partie N-terminale, sans domaines transmembranaires est suffisante pour l'association de différents domaines et a donc été appelé domaine de tétramérisation (ou domaine T1) (Shen *et al.*, 1993). Le domaine T1 est commun à tous les canaux potassiques dépendants du voltage. On trouve également un motif de liaison PDZ (ETDV dans

Kv1.4) localisé au niveau C-terminal dans les canaux de type *Shaker*. L'interaction entre différents membres de la famille PDZ pourrait ainsi dicter le regroupement de canaux ainsi que leur localisation cellulaire (Kim & Sheng, 1996). Il est à noter qu'en absence du domaine T1, les sous-unités peuvent former un tétramère fonctionnel, impliquant par conséquent un autre domaine de liaison. Cet autre domaine se situe dans le premier segment transmembranaire (Babila *et al.*, 1994). Au contraire, les sous-unités ERG et KvLQT1 qui sont également des canaux dépendants du voltage semblent avoir leur domaine de liaison dans extrémité C-terminale (Kupersmidt *et al.*, 1998; Ludwig *et al.*, 1997).

Les canaux Kir sont retrouvés sous forme d'homo ou d'hétéro tétramères (Schram *et al.*, 2002a). Cependant, la façon dont ces sous-unités s'assemblent est peu claire. En effet, plusieurs sites ont été décrits comme étant responsable de l'assemblage de ces canaux, notamment la partie C-terminale et le segment transmembranaire M2 (Tinker *et al.*, 1996).

En plus de l'assemblage des sous-unités  $\alpha$ , les complexes de canaux ioniques peuvent contenir des sous-unités  $\beta$ , qui comme décrit précédemment, peuvent moduler les propriétés biophysiques et pharmacologiques des sous-unités  $\alpha$ .

On connaît peu d'éléments sur la façon dont KvLQT1 et minK interagissent. Kurokawa et al ont montré, par des techniques de mutagenèse dirigée que minK ne résidait pas dans la région du pore du canal assemblé (Kurokawa *et al.*, 2001). Cette étude va à l'encontre de la pensée que le domaine transmembranaire de minK participe à la détermination de la sélectivité du pore de  $I_{Ks}$  (Tai & Goldstein, 1998).

Lorsque KChIP2 est coexprimée avec Kv4.3 modifié (sans extrémité N-terminale), il n'est plus capable de moduler son expression, indiquant l'importance de la portion N-terminale de Kv4 dans l'action de KChIP2 (Decher *et al.*, 2001). Au contraire l'élimination de l'extrémité N-terminale de KChIP2 n'a aucun effet sur la modulation de Kv4 lorsque comparé au type sauvage (An *et al.*, 2000).

## **II- Courants potassiques cardiaques endogènes. Propriétés ioniques et base moléculaire**

### **II-1 Critères d'association entre un canal cloné et un courant endogène cardiaque**

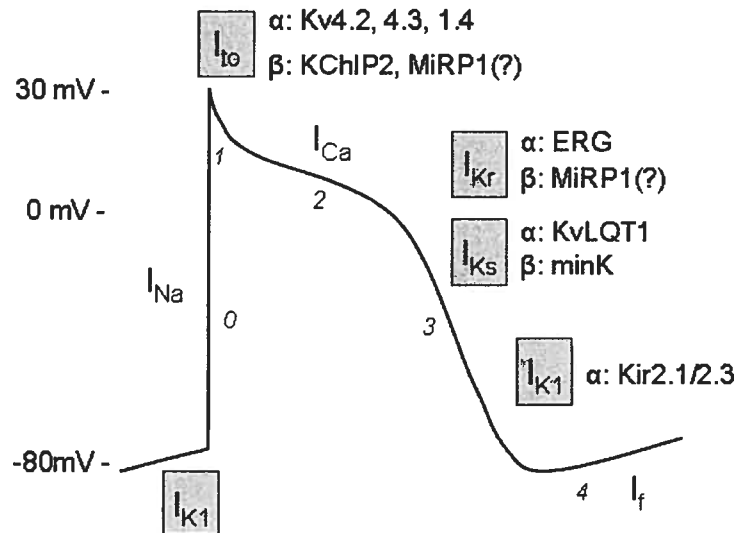
Afin de tester l'hypothèse selon laquelle un canal cloné est responsable du courant correspondant observé dans les myocytes cardiaques, plusieurs facteurs doivent être évalués :

- 1- Les propriétés biophysiques de canaux clonés (cinétiques d'activation et d'inactivation, dépendance au voltage, conductance, propriétés de rectification, sélectivité ionique) doivent être en accord avec celle du courant endogène. Pour étudier les propriétés biophysiques d'un canal cloné, il est possible de transférer l'ADN complémentaire du canal dans un système d'expression (cellules CHO par exemple). L'enregistrement des courants qui en résultent par la technique de Patch Clamp permet d'établir les caractéristiques biophysiques du canal.
- 2- La pharmacologie des agents connus pour agir directement avec le pore du canal (ex : TEA, dendrotoxine, quinidine) doit être similaire entre le canal cloné et le courant endogène cardiaque.
- 3- Les techniques d'immunohistochimie avec des anticorps spécifiques produits contre le clone étudié doivent être utilisés afin de confirmer la présence du canal dans les cellules cardiaques.
- 4- L'élimination du gène possiblement codant pour le canal endogène d'intérêt par des techniques d'antisens ou par l'utilisation d'animaux génétiquement modifiés doit permettre de confirmer l'identité du canal codé par ce gène.

### **II-2 Rôles des canaux potassiques dans le potentiel d'action cardiaque et leur importance dans la fonction électrophysiologique**

Les canaux potassiques portent des courants sortants à des potentiels physiologiques. Par conséquent, certains permettent de garder le potentiel

membranaire proche du potentiel d'équilibre du potassium, et d'autres assurent la repolarisation du potentiel d'action (figure 2).



**Figure 2:** Potentiel d'action cardiaque montrant les différents canaux potassiques impliqués dans la repolarisation et le maintien du potentiel de repos ainsi que les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  les constituant (modifiée à partir de Pourrier *et al.*, 2003).

## II-2-1 Courant transitoire sortant, $I_{to}$

### II-2-1-1 Description et Rôle physiologique

Le courant transitoire sortant ( $I_{to}$ ) s'active et s'inactive rapidement suite à une dépolarisation prolongée (figure 3). Initialement décrit dans les neurones et appelé courant de type A (Hagiwara *et al.*, 1961),  $I_{to}$  est divisé en deux composantes distinctes. Le courant  $I_{to1}$  est un courant potassique sensible au 4-Aminopyridine (4-AP), indépendant du calcium. L'autre composante,  $I_{to2}$  est un courant chlore résistant

au 4-AP, activé par le calcium. Pour plus de clarté,  $I_{to1}$  sera appelé  $I_{to}$  dans la suite de cette thèse. Il ne sera plus fait mention de  $I_{to2}$ .

$I_{to}$  est lui-même constitué d'une composante rapide qui s'active, s'inactive rapidement et est réactivable rapidement après l'inactivation ( $I_{to}$  rapide ou  $I_{to,r}$ ) et d'une composante lente qui s'active rapidement, s'inactive plus lentement et est réactivable lentement après l'inactivation ( $I_{to}$  lent ou  $I_{to,s}$ ). Les différentes cinétiques s'expliquent par une composition moléculaire distincte qui sera traitée dans une prochaine section.

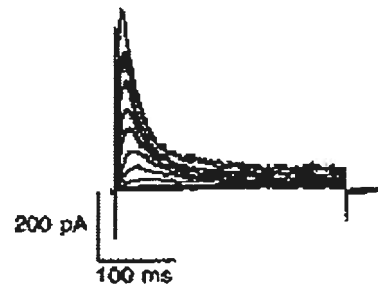
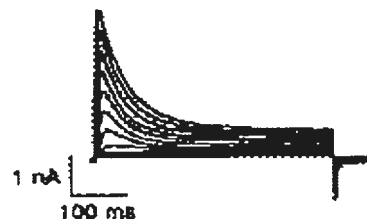
$I_{to}$  est responsable de la phase de repolarisation rapide du potentiel d'action cardiaque (phase 1) dans les oreillettes et dans les ventricules de la plupart des espèces (figure 2) (Oudit *et al.*, 2001). De ce fait,  $I_{to}$  influence le courant calcique de type L lors de la phase du plateau, modulant par le fait même le phénomène d'excitation contraction et par conséquent la contractilité du myocarde. Il a été démontré chez les rongeurs que  $I_{to}$  était impliqué dans le maintien de la durée du potentiel d'action (Guo *et al.*, 2000) et que l'élimination sélective de  $I_{to}$  provoquait un allongement du segment QT accompagné de post dépolarisations précoces (Barry *et al.*, 1998; Guo *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 1999b). Cependant, le rôle de  $I_{to}$  dans la durée du potentiel d'action n'est pas aussi clair puisque l'on observe des effets différents selon le modèle expérimental utilisé. Chez la chèvre, l'inhibition de  $I_{to}$  par un agent pharmacologique (le 4-AP) provoque l'allongement de l'APD<sub>70</sub>. Chez l'humain, la fibrillation auriculaire provoque un remodelage ionique amenant à la diminution du courant transitoire sortant et au raccourcissement de la durée du potentiel d'action auriculaire (Bosch *et al.*, 1999). Par contre, l'inhibition de  $I_{to}$  au niveau des fibres de Purkinje chez le chien provoque un allongement de la durée du potentiel d'action (Han *et al.*, 2000).

Un modèle mathématique a permis de mettre en évidence le rôle de  $I_{to}$  dans la morphologie du potentiel d'action auriculaire (Courtemanche *et al.*, 1998). Ainsi, la morphologie du potentiel d'action est triangulaire lorsque  $I_{to}$  a une conductance élevée, une morphologie en forme de « spike-and-dome » lorsque sa conductance est intermédiaire et une forme rectangulaire lorsque sa conductance est faible (Courtemanche *et al.*, 1998).

Chez les rongeurs, il existe un mécanisme de compensation entre les deux composantes d' $I_{to}$ . Ainsi, la perte de  $I_{to,f}$  met en évidence la composante lente  $I_{to,s}$  plus importante, contrecarrant alors la perte de la composante rapide (Barry *et al.*, 1998).

Il est responsable de la forme « en cloche » du potentiel d'action cardiaque au niveau de l'épicaire ventriculaire (Litovsky & Antzelevitch, 1988) (figure 4A). Ainsi, les cellules ventriculaires du mi-myocarde et de l'épicaire (mais pas les cellules endocardiques) ont un potentiel d'action avec une phase 1 caractéristique due à la présence du courant transitoire sortant (figure 4). L'expression transmurale du canal portant  $I_{to}$  provoque une différence dans la magnitude de l'encoche caractéristique du potentiel d'action, elle-même responsable d'un gradient de potentiel, menant à l'enregistrement de l'onde J sur l'électrocardiogramme. Une exagération de ce gradient mène notamment à l'apparition d'ondes J pathophysiologiques ou à l'élévation du segment ST (Antzelevitch, 2001a).



**A** Kv4.2 dans les cellules L**B**  $I_{to}$  ventriculaire de rat

**Figure 3:** Enregistrement du courant transitoire sortant  $I_{to}$ . A, exemple de courant enregistré à partir de cellules L transfectées avec l'ADN complémentaire de Kv4.2. B, exemple de courant transitoire sortant endogène enregistré à partir de cellule ventriculaire de rat (modifiée à partir de Fiset *et al.*, 1997b).

### II-2-1-2 Propriétés ioniques

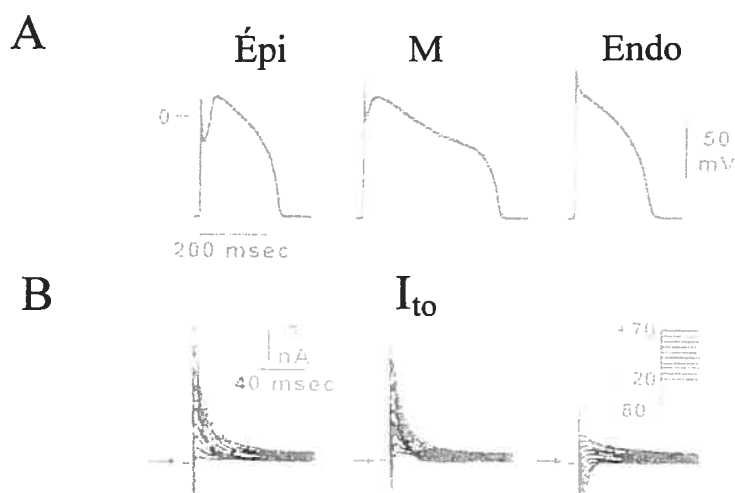
Les propriétés ioniques du courant transitoire sortant diffèrent selon l'espèce.

Ainsi, chez l'humain,  $I_{to}$  s'inactive rapidement avec une dépendance au voltage de l'inactivation plus négative dans l'oreillette que dans le ventricule (Amos *et al.*, 1996). Sa réactivation après inactivation est également plus rapide dans les oreillettes. Le  $I_{to}$  auriculaire est aussi plus sensible au 4-AP que le  $I_{to}$  ventriculaire. Dans le ventricule, il a des propriétés différentes selon qu'il soit enregistré au niveau épicardique ou endocardique. En effet, la densité de courant est quatre fois plus importante au niveau des cellules sous épicardiques (environ 10.6 pA/pF sous épicarde vs 2.63 pA/pF sous endocarde) (Nabauer *et al.*, 1996). Cette différence est retrouvée dans d'autres espèces telles que chez le chien (Liu *et al.*, 1993) et les félins (Furukawa *et al.*, 1990). Par contre, les cinétiques d'inactivation sont similaires dans l'épicarde et dans l'endocarde humain ( $\approx 64$ ms) (Wettwer *et al.*, 1994). Par ailleurs, le potentiel auquel 50% du courant est disponible pour être activé (inac  $V_{1/2}$ ) (mesuré à partir de l'inactivation à l'état d'équilibre) est plus négatif dans les cellules sous-endocardiques ( $V_{1/2} \approx -17.6$  mV et  $-32$  mV selon les groupes qui ont étudié ces propriétés) que sous-épicardiques ( $V_{1/2} \approx -9.5$  mV et  $\approx -25$  mV) (Nabauer *et al.*, 1996; Wettwer *et al.*, 1994). Chez le chien, le  $V_{1/2}$  de l'inactivation au niveau de l'épicarde est encore plus négatif ( $\approx -43$  mV vs  $\approx -29$  mV dans endo) (Yu *et al.*, 2000) Cependant, le potentiel auquel 50% du courant est activé ( $V_{1/2}$ ) n'est lui, pas modifié (Nabauer *et al.*, 1996). Les cinétiques d'inactivation ne sont pas non plus différentes dans les deux régions (Nabauer *et al.*, 1996).

La densité de courant  $I_{to}$  est plus importante dans le ventricule droit que dans le gauche (Di Diego *et al.*, 1996). Une autre particularité du courant  $I_{to}$  humain est sa réactivation après inactivation, beaucoup plus rapide dans le tissu sous-épicardique ( $\approx 46.1$  ms) que sous-endocardique ( $\approx 1800$  ms). Chez le chien, la même tendance est observée (30 ms épi vs 950 ms endo) (Yu *et al.*, 2000). Au niveau du potentiel d'action humain, une encoche caractéristique de la phase de repolarisation rapide est observée dans le tissu sous-épicardique (Nabauer *et al.*, 1996). Les différentes propriétés ioniques du courant  $I_{to}$  selon qu'il soit localisé dans l'épicarde ou dans

l'endocarde sont en partie responsables de la forme du potentiel d'action dans ces régions et suggèrent une base moléculaire distincte (figure 4).

$I_{to}$  est sensible à l'angiotensine II. Dans les cellules épicrodiques ventriculaires de chien, la présence d'angiotensine II permet de modifier les propriétés ioniques du courant de façon à ce qu'il ressemble au courant  $I_{to}$  endocardique (Yu *et al.*, 2000) suggérant l'implication du système rénine-angiotensine dans la régulation de  $I_{to}$ .  $I_{to}$  a également été décrit dans le nœud auriculo-ventriculaire avec des propriétés ioniques similaires à celles décrites précédemment (Mitcheson & Hancox, 1999). Dans les fibres de Purkinje chez le chien (Han *et al.*, 2000) et l'humain (Han *et al.*, 2002b),  $I_{to}$  a des propriétés très différentes de celles observées dans le ventricule. Ainsi, il est sensible au TEA, environ 9 fois plus sensible au 4-AP et se réactive plus lentement suggérant une composition moléculaire distincte de celle du  $I_{to}$  ventriculaire (Han *et al.*, 2000).



**Figure 4:** Hétérogénéité dans la forme de potentiels d'action enregistrés dans les différentes couches ventriculaires. Implication du courant transitoire sortant  $I_{to}$ . A, potentiels d'action enregistrés à partir de myocytes isolés de l'épicarde, de la région du mi-myocarde et de l'endocarde ventriculaire de chien. B, courant transitoire

sortant enregistré dans les trois régions (modifiée à partir de Antzelevitch *et al.*, 2001a).

### II-2-1-3 Base moléculaire

#### II-2-1-3-1 Sous-unités $\alpha$ impliquées dans la formation du courant $I_{to}$

Plusieurs sous-unités  $\alpha$  telles que Kv4.2/4.3, Kv1.4 et Kv3.4, lorsque exprimées dans des systèmes d'expression, expriment un courant de type  $I_{to}$ . Toutes ces sous-unités sont exprimées dans le myocarde à un niveau variable (Coetzee *et al.*, 1999). Basé sur leur propriété biophysique, il est accepté que Kv4.2/4.3 encode la composante rapide de  $I_{to}$  alors que Kv1.4 encode sa composante lente dans plusieurs espèces telles que le rat, la souris, le furet et le lapin (Nerbonne, 2000). Kv4.3 a été associé au courant transitoire sortant endogène chez le chien (Dixon *et al.*, 1996). En effet, le niveau d'expression d'ARNm de Kv4.3 dans le ventricule, ses propriétés pharmacologiques et ses propriétés biophysiques en ont fait le candidat principal (Dixon *et al.*, 1996). Par ailleurs, chez l'humain, la corrélation entre le courant  $I_{to}$  endogène et Kv4.3 a été faite en étudiant un cœur défaillant (Kaab *et al.*, 1998). Ainsi, la diminution d'ARNm codant pour Kv4.3 dans le cœur défaillant suit la diminution de la densité de courant  $I_{to}$  endogène (Kaab *et al.*, 1998). Chez la souris, l'ARN messager des sous-unités Kv4.2 et Kv4.3 est retrouvé dans les oreillettes et dans les ventricules (Xu *et al.*, 1999b). Le fait que le courant endogène soit similaire dans les deux tissus au niveau électrophysiologique indique une base moléculaire semblable. L'étude de souris transgénique a permis de démontrer que le courant endogène  $I_{to}$  était porté par les mêmes sous-unités dans les oreillettes et ventricules. Ainsi, ces souris expriment un gène de Kv4.2 modifié, ne permettant pas l'expression d'un canal fonctionnel (dominant négatif). Cette mutation est introduite dans le pore du canal. Elle concerne le résidu 362 (le tryptophane est remplacé par une phénylalanine). Les souris exprimant un tel gène ne possèdent pas la composante rapide du courant  $I_{to}$  alors que les autres courants participant au potentiel d'action sont intacts (Barry *et al.*, 1998) voire sur régulés (Guo *et al.*, 2000). Des études

utilisant des techniques d'antisens, d'injection d'adénovirus, de coexpression et de coimmunoprécipitation ont permis de démontrer le rôle de Kv4.2 et Kv4.3 dans la formation de  $I_{to}$  ventriculaire chez le rat (Fiset *et al.*, 1997; Guo *et al.*, 2002).

L'utilisation d'adénovirus a également permis d'identifier Kv1.4 comme étant la base moléculaire de  $I_{to,s}$  chez le rat (Kassiri *et al.*, 2002).

Les fibres de Purkinje de chien n'expriment pas significativement de sous-unités Kv4.2 et Kv1.4 (Han *et al.*, 2002a) alors que le niveau de Kv4.3 est équivalent à celui observé dans le mi-myocarde (Han *et al.*, 2002a). Les propriétés ioniques de  $I_{to}$  dans les fibres de Purkinje ne suggèrent pas l'implication des sous-unités Kv4. Par contre, les sous-unités Kv3.4 ont des propriétés similaires à celle de  $I_{to}$  endogène dans ce tissu (sensibilité au TEA notamment) (Han *et al.*, 2000) et y sont exprimées en grande quantité (Han *et al.*, 2002a), suggérant ainsi leur importance dans l'électrophysiologie des fibres de Purkinje.

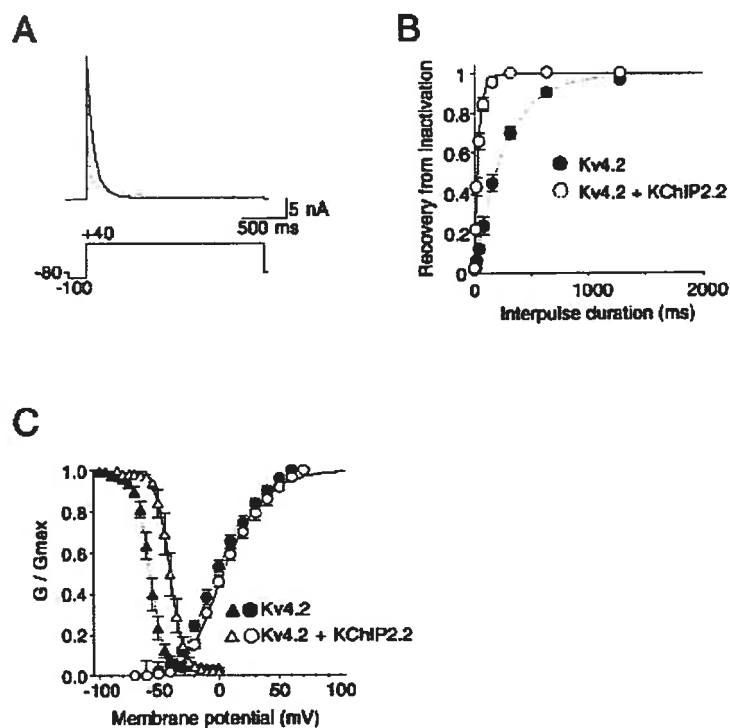
#### **II-2-1-3-2 Sous-unités $\beta$ impliquées dans la constitution du courant $I_{to}$ et leur influence sur les sous-unités $\alpha$ Kv4**

Le gradient d'expression de  $I_{to}$  au niveau des différentes couches du ventricule est source de discussions. La découverte de la sous-unité  $\beta$  KChIP2 par An et al (An *et al.*, 2000) a permis de répondre à certaines questions concernant les différences observées entre les propriétés ioniques du courant endogène  $I_{to}$  et celles des sous-unités clonées telles que Kv4.2. L'une des principales différences est la réactivation du canal qui est plus rapide chez le canal endogène  $I_{to}$  que chez la sous-unité Kv4.2/4.3 seule, exprimée dans un système hétérologue. KChIP2, qui est fortement exprimée dans le cœur, interagit avec la famille de sous-unité Kv4. Elle augmente le nombre de canaux fonctionnels (Kv4) à la surface membranaire, accélère les propriétés de réactivation du canal, ralentit ses cinétiques d'inactivation et déplace la dépendance au voltage de l'activation vers des potentiels plus négatifs (An *et al.*, 2000; Bähring *et al.*, 2001b) (Figure 5).

Au niveau fonctionnel, des souris transgéniques n'exprimant pas le gène KChIP2 sont capables d'éliminer presque complètement le courant endogène  $I_{to}$

menant à une augmentation de la durée du potentiel d'action, mais de manière surprenante, sans répercussion sur l'intervalle QT (Kuo *et al.*, 2001). Ces souris sont également plus susceptibles aux tachycardies ventriculaires (Kuo *et al.*, 2001). Ceci étant en contradiction avec l'étude de Guo *et al.*, 2000 qui démontrait l'allongement du segment QT associé à la perte de  $I_{to}$  suite à l'élimination de la sous-unité  $\alpha$ . La surexpression du gène exprimant le dominant négatif Kv4.2 conduite par l'expression du gène de la chaîne lourde de la myosine peut conduire à des effets non spécifiques (Kuo *et al.*, 2002). Les phénotypes observés peuvent ainsi varier selon la technique utilisée pour inhiber l'expression d'un gène.

La sous-unité  $\beta$  MiRP1 (MinK Related Peptide 1) affecte également les cinétiques de Kv4.2 dans le système d'expression des oeufs de Xénope (Zhang *et al.*, 2001a). Elle ralentit l'activation et l'inactivation de Kv4.2 et induit un déplacement de la dépendance au voltage de l'activation et de l'inactivation vers des potentiels plus positifs (Zhang *et al.*, 2001a). L'ensemble de ces effets a pour conséquence de rendre le canal constitué de Kv4.2 plus MiRP1 plus semblable au courant endogène. Cependant, l'impact physiologique de l'association entre ces deux sous-unités semble limité, si on se fie au faible niveau d'expression de messenger de MiRP1 dans le ventricule (Yu *et al.*, 2001). Les sous-unités Kv $\beta$ 1.3 (humain) et Kv $\beta$ 3 (humain et furet) ont été cloné à partir du cœur (England *et al.*, 1995b; England *et al.*, 1995a). L'expression de ces sous-unités est tissu-spécifique puisqu'il apparaît que le niveau d'expression de Kv $\beta$ 3 dans le myocarde humain est deux fois plus élevé dans le ventricule que dans l'oreillette (England *et al.*, 1995b). Kv $\beta$ 3 peut augmenter la vitesse d'inactivation des courants portés par la sous-unité Kv1.4 chez l'humain et le furet (England *et al.*, 1995a; Majumder *et al.*, 1995). Les sous-unités Kv $\beta$ 1 n'affectent pas les propriétés de « gating » de Kv4.3 mais augmentent la densité de courant et l'expression protéique, ceci étant dépendant de la présence de l'extrémité C-terminale de Kv4.3 (Heinemann *et al.*, 1995).



**Figure 5 :** Effets de KCHIP2 sur Kv4.2. A, enregistrement de courant à partir de cellules HEK293 co-transfectés avec Kv4.2 et KCHIP2. La ligne pointillée représente le courant enregistré lorsque Kv4.2 est exprimé seul. B, réactivation des canaux Kv4.2 suivant leur inactivation mesurée à -80mV avec deux pulses identiques à +40mV et une durée variable entre les deux pulses. Le graphique montre la fraction de courant réactivable après l'inactivation en fonction de l'intervalle de temps entre les deux pulses. C, graphique montrant la dépendance au voltage de l'inactivation et de l'activation de Kv4.2, avec ou sans KCHIP2 (modifiée à partir de Bähring *et al.*, 2002).

## II-2-2 Courant retardé sortant à rectification, $I_K$

### II-2-2-1 Description et Rôle physiologique

Le courant retardé sortant à rectification,  $I_K$  est un courant potassique responsable de la phase 3 du potentiel d'action cardiaque. Il a été appelé originalement « retardé » du fait de son activation retardé par rapport au courant sodique qui s'active et s'inactive rapidement. Il se constitue de 3 composantes :  $I_{Ks}$  qui est la composante s'activant lentement,  $I_{Kr}$ , la composante s'activant rapidement et  $I_{Kur}$  qui est la composante s'activant ultra-rapidement. Chaque composante possède des propriétés pharmacologiques et électrophysiologiques (dépendance au voltage et au temps) propres ainsi qu'une base moléculaire unique (Sanguinetti & Jurkiewicz, 1990; Sanguinetti & Jurkiewicz, 1991). Les composantes rapides et lentes peuvent être différenciées par leur propriété conductrice. En effet, en présence d'une concentration symétrique de potassium, les conductions d'un canal unique  $I_{Kr}$  et  $I_{Ks}$  sont respectivement de 10-13 et 3-5 pS (Balsler *et al.*, 1990; Veldkamp *et al.*, 1993).  $I_K$  possède une influence sur l'activité pacemaker de la cellule. En effet, la désactivation de  $I_K$  (le passage de canal de l'état ouvert à l'état fermé) contribue à la dépolarisation diastolique (Irisawa *et al.*, 1993). Par ailleurs,  $I_{Kr}$  s'active à des potentiels plus négatifs que  $I_{Ks}$  et montre une rectification entrante à des potentiels plus positifs, due en partie à l'inactivation de type C (qui sera décrite au paragraphe II-3-2) (Schonherr & Heinemann, 1996).

#### II-2-2-1-1 Courant retardé sortant à rectification, composante rapide ( $I_{Kr}$ )

Le rôle de  $I_{Kr}$  dans la repolarisation du potentiel d'action est dépendant de l'intervention de différents paramètres, soit du niveau d'expression des sous-unités qui le composent, des cinétiques particulières du canal, de l'influence des autres courants qui contribuent à la fréquence d'activation du potentiel d'action et enfin, de la modulation par le milieu cellulaire sous différentes conditions (Tseng, 2001).

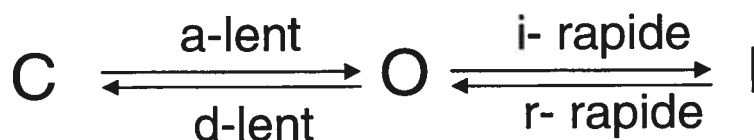


Le niveau d'expression des sous-unités formant  $I_{Kr}$  est variable suivant les différentes régions du cœur et selon l'espèce. Cette partie sera traitée plus en détail dans la section II-4.  $I_{Kr}$  est hautement sélectif pour le potassium, a une activation et une désactivation dépendante du voltage ainsi qu'une rectification marquée à des potentiels supérieur à 0 mV (Sanguinetti & Jurkiewicz, 1990). Malgré le fait que  $I_{Kr}$  soit activé suite à une dépolarisation de la membrane ( $C \rightarrow O$ ), l'inactivation rapide du canal ( $O \rightarrow I$ , causant la rectification entrante) limite la quantité de courant sortant à des potentiels positifs, soit pendant la phase 2 du potentiel d'action (figure 6). À mesure que la membrane revient à des potentiels plus négatifs (ou se repolarise), les canaux portant  $I_{Kr}$  rentrent en phase de réactivation suite à l'inactivation ( $I \rightarrow O$ ) (transition rapide) et sont donc de nouveau à l'état ouvert. L'augmentation du courant sortant qui en résulte contribue de nouveau à la repolarisation (la phase 3 du potentiel d'action) (Mitcheson & Sanguinetti, 1999). Le courant sortant  $I_{Kr}$  persiste ainsi jusqu'à la fin du potentiel d'action à cause de la désactivation du canal (transition lente) et à une diminution de la force de conduite pour les courants potassiques sortants (Tseng, 2001).

Par conséquent, les mécanismes d'activation, de réactivation après l'inactivation et de désactivation déterminent en partie l'importance de  $I_{Kr}$  dans la forme du potentiel d'action. Le rôle de  $I_{Kr}$  dans le potentiel d'action dépend par ailleurs de la configuration et de la fréquence d'activation du potentiel d'action. À +20mV,  $I_{Kr}$  a une constante de temps allant de 15 à 200 ms selon les espèces (Tseng, 2001). Par conséquent, les potentiels d'action ayant un long plateau à des potentiels positifs (exemple: le potentiel d'action ventriculaire du cobaye) vont permettre l'activation complète de  $I_{Kr}$ . Cette activation est moins favorisée lorsque le plateau du potentiel d'action est plus court et se situe à des potentiels plus négatifs (exemple: PA auriculaire et ventriculaire de rat) (Tseng, 2001).

Finalement, le rôle de  $I_{Kr}$  dans le potentiel d'action dépend du milieu cellulaire. Ainsi, et paradoxalement,  $I_{Kr}$  est augmenté en présence d'une concentration extracellulaire élevée de potassium (Sanguinetti & Jurkiewicz, 1992). Normalement, une telle augmentation devrait diminuer le courant sortant du fait de la présence d'un gradient chimique à travers la membrane moins important (Sanguinetti & Jurkiewicz, 1992). L'augmentation du courant dans cette condition

s'explique par un déplacement de la dépendance au voltage de l'inactivation vers des potentiels plus positifs alors que la dépendance au voltage de l'activation reste inchangée (Wang *et al.*, 1996b). Ce déplacement de la courbe d'inactivation augmente la disponibilité du courant à des potentiels plus positifs, élargissant la fenêtre de conduction (soit les potentiels auxquels HERG conduit à l'état d'équilibre). Par conséquent, il y a plus de canaux disponibles pour être activé lors de la phase de plateau du potentiel d'action. Cet effet a été souligné par une étude clinique démontrant une diminution de l'intervalle QT de 24 % chez des patients possédant une mutation dans le gène codant pour HERG lorsque la concentration de potassium dans le serum est augmenté (Compton *et al.*, 1996).



**Figure 6:** États de transition expliquant le fonctionnement du canal  $I_{Kr}$ . La transition entre l'état fermé (C) et ouvert (O) est lente alors que celle entre l'état ouvert (O) et Inactivé (I) est beaucoup plus rapide. Ainsi, suite à une dépolarisation maintenue, le canal rentre à l'état ouvert puis inactivé. À des dépolarisations plus positives, l'état inactivé est favorisé, expliquant ainsi la rectification entrante observée. a, activation; i, inactivation; r, réactivation; d. désactivation.

#### II-2-2-1-2 Courant retardé sortant à rectification, composante lente $I_{Ks}$

La participation de  $I_{Ks}$  dans la repolarisation est moins claire du fait de ses cinétiques lentes et de son activation à des potentiels positifs.  $I_{Ks}$  augmente graduellement lors du plateau du potentiel d'action car son activation est retardée et très lente. La désactivation lente de  $I_{Ks}$  peut être un point important dans le

raccourcissement du potentiel d'action auriculaire et ventriculaire, dépendamment de la fréquence de stimulation. Ainsi, l'accumulation de courant  $I_{Ks}$  à un rythme cardiaque élevé pourrait contribuer au raccourcissement du potentiel d'action (Jurkiewicz & Sanguinetti, 1993). Cette accumulation de courant s'explique de la façon suivante : si le canal est activé alors que la désactivation ( $O \rightarrow C$ ) est incomplète, le canal reste alors plus longtemps à l'état ouvert et permet le passage de plus de courant lors de l'activation suivante. Chez le cobaye, la diminution de  $I_{Ks}$  est en partie responsable de la lente dépolarisation diastolique des cellules sinusales (Anumonwo *et al.*, 1992).

L'importance de  $I_{Ks}$  dans la repolarisation cardiaque est source de discussions principalement parce qu'il existe peu d'agents pharmacologiques suffisamment spécifiques pour inhiber  $I_{Ks}$  et juger l'effet de cette inhibition sur la durée du potentiel d'action.

$I_{Ks}$  a un rôle important lorsqu'il s'agit de contrecarrer l'effet de l'inhibition de  $I_{Kr}$  par des agents pharmacologiques (Varro *et al.*, 2000), d'où la notion de courant de réserve. Le rôle de  $I_{Ks}$  pourrait donc être d'éviter toute prolongation excessive du potentiel d'action en cas de blocage d'autres courants ioniques repolarisants tels que  $I_{Kr}$ . Une étude *in vivo* menée par Nakashima *et al.*, 2003 a permis de démontrer l'importance de  $I_{Ks}$  dans la repolarization auriculaire et ventriculaire chez le chien en utilisant un agent pharmacologique spécifique, le HMR 1556. Elle met en évidence cette notion de courant de réserve en démontrant l'importance de  $I_{Ks}$  lorsque  $I_{Kr}$  est inhibé de manière spécifique. L'effet auriculaire étant dépendant de l'activité sympathique alors que l'allongement de l'intervalle QT est indépendant de l'activité sympathique.

Cette étude va dans le même sens que celle de Volders *et al.*, 2003 où il apparaît que  $I_{Ks}$  contribue au maintien de la durée du potentiel d'action lorsqu'il se trouve sous influence du système sympathique (Volders *et al.*, 2003). En effet, le système sympathique agit sur d'autres courants, et augmente notamment le courant calcique, provoquant alors un allongement de la durée du potentiel d'action. L'augmentation de  $I_{Ks}$  permet donc de contrecarrer cet effet. L'action sympathique sur  $I_{Ks}$  a aussi pour effet de limiter les effets de l'inhibition de  $I_{Kr}$  sur le prolongement du potentiel d'action (Volders *et al.*, 2003).

### II-2-2-1-3 Courant retardé sortant à rectification, composante ultra rapide ( $I_{Kur}$ )

$I_{Kur}$  est un courant important dans la repolarisation du potentiel d'action dans l'oreillette chez l'humain (Wang *et al.*, 1993b). Ceci est supporté par le fait que l'inhibition de 50% de  $I_{Kur}$  par le 4-AP provoque une prolongation du potentiel d'action auriculaire humain de 66% (Wang *et al.*, 1993b). L'inhibition de ce courant par des agents pharmacologiques démontrent son importance dans la repolarisation des cardiomyocytes chez l'humain (Wang *et al.*, 1993b), chez le chien (Yue *et al.*, 1996a) et la souris (Fiset *et al.*, 1997a). L'inhibition de  $I_{Kur}$  devrait ainsi prolonger la période réfractaire auriculaire chez l'humain et par conséquent, apporter une protection contre les arythmies de réentrée telles que la fibrillation auriculaire. Le fait que  $I_{Kur}$  soit absent dans le ventricule chez l'humain (Li *et al.*, 1996a) devrait permettre le développement d'agents spécifiques, agissant exclusivement au niveau des oreillettes.

### II-2-2-2 Propriétés ioniques

$I_{Kr}$  et  $I_{Ks}$  s'activent à différents potentiels membranaires (-40 mV et -20 mV respectivement) (Sanguinetti & Jurkiewicz, 1990).  $I_{Kr}$  a une courbe courant-voltage qui ne répond pas à la loi d'ohm. En effet, elle est non linéaire et montre une rectification entrante à des potentiels positifs à 0 mV due à l'inactivation du canal. Au contraire,  $I_{Ks}$  a une courbe courant-voltage qui est linéaire.  $I_{Kr}$  peut se distinguer de  $I_{Ks}$  par ses cinétiques d'activation plus rapide, son potentiel de seuil d'activation plus négatif, et sa sensibilité aux méthanesulfanilides tels que le E-4031 (Sanguinetti & Jurkiewicz, 1990). Chez le cobaye, l'amplitude des courants de queue (résultant de la désactivation) de  $I_{Kr}$  correspond à 10% de l'amplitude des courants de queue de  $I_{Ks}$  lorsque le canal est complètement activé (Sanguinetti & Jurkiewicz, 1991).

La dépendance au voltage de l'activation, de l'inactivation et de la réactivation de  $I_{Kr}$  sont similaires dans les myocytes de différentes régions du cœur et dans différentes espèces (Feng *et al.*, 1998b; Li *et al.*, 1996b; Liu & Antzelevitch,

1995; Sanguinetti & Jurkiewicz, 1991; Wang *et al.*, 1994). Ainsi, chez le chien, la dépendance au voltage de l'activation de  $I_{Kr}$  est similaire dans l'oreillette droite et gauche, soit un  $V_{1/2}$  (potentiel auquel 50% du courant est activé) d'environ -10 mV. L'activation du canal est déclenchée à des potentiels de -40 à -30 mV et atteint un plateau à des potentiels de 20 à 30 mV (Tseng, 2001). Les cinétiques de désactivation et d'activation sont toutefois variables selon l'espèce et vont de 119 à 600 ms à -40 mV et de 15 à 200 ms à 20 mV et, respectivement (Tseng, 2001).

$I_{Ks}$  s'active lentement et se désactive rapidement dans les cellules ventriculaires de chien (Volders *et al.*, 2003). À des pulses de +20 mV, 50% de l'activation du canal se fait en 700 ms avec peu de courant généré dans les 100 premières millisecondes. 50% de la désactivation est accomplie en si peu que 40 ms à -80 mV (Volders *et al.*, 2003). Dans les cellules auriculaires de chien,  $V_{1/2}$  de  $I_{Ks}$  est activé se situe à 17.2 mV dans l'oreillette gauche versus 18.3 mV dans l'oreillette droite (Li *et al.*, 2001). L'activation est biexponentielle dans les deux tissus. La constante de temps tau rapide est indépendante du voltage (environ 300 ms) et la constante de temps lente tau lent est dépendante du voltage (diminue à des potentiels plus positifs) (environ 2400 ms à 30 mV) (Li *et al.*, 2001). De la même façon, il n'y a pas de différence dans les cinétiques de désactivation entre l'oreillette droite et la gauche. La désactivation, comme l'activation est biexponentielle avec des constantes de temps d'environ 90 ms et 370 ms (Li *et al.*, 2001). La magnitude de  $I_{Ks}$  est dépendante d'ions divalents tels que le  $Mg^{2+}$  intracellulaire qui diminue  $I_{Ks}$  tandis que l'augmentation de la concentration intracellulaire de  $Ca^{2+}$  augmente  $I_{Ks}$  (Duchatelle-Gourdon *et al.*, 1991; Nitta *et al.*, 1994).

$I_{Kur}$  s'active à des potentiels correspondant au plateau et à une activation très rapide, de l'ordre de 1 à 10 ms à température ambiante. Puisque l'activation de  $I_{Kur}$  est dépendante de la température, l'activation est très rapide à des températures plus physiologiques la rendant quasi instantanée (Wang *et al.*, 1993b).  $I_{Kur}$  humain est activé à 50% à -4 mV (Wang *et al.*, 1993a).  $I_{Kur}$  possède une rectification sortante, et au niveau du courant unitaire, possède une conductance de 10 à 14 pS (Yue & Marban, 1988). L'inactivation de  $I_{Kur}$  est négligeable dans les conditions

physiologiques vu la durée du potentiel d'action. En effet, l'utilisation d'un pulse similaire à la durée du potentiel d'action ne permet pas d'observer l'inactivation du canal (Wang *et al.*, 1993b). La réactivation après inactivation est également très lente, impliquant une grande dépendance du canal à la fréquence utilisée (Feng *et al.*, 1998a). Les propriétés ioniques de  $I_{Kur}$  varient avec l'espèce (notamment chez l'humain et le chien), suggérant une base moléculaire distincte.

### II-2-2-3 Base moléculaire

Plusieurs sous-unités forment le courant endogène  $I_K$ . Les sous-unité  $\alpha$  ether-a-go-go (ERG) et  $\beta$  MiRP1 portent le courant  $I_{Kr}$  (Abbott *et al.*, 1999) tandis que les sous-unités  $\alpha$  KvLQT1 et  $\beta$  minK sont responsables du courant  $I_{Ks}$  (Barhanin *et al.*, 1996; Sanguinetti *et al.*, 1996). Cependant, le rôle de MiRP1 dans le courant  $I_{Kr}$  est quelque peu controversé (Weerapura *et al.*, 2002). La sous-unité  $\alpha$  Kv1.5 est responsable de  $I_{Kur}$  chez l'humain (Feng *et al.*, 1997) tandis que Kv3.1 porte ce même courant chez le chien (Yue *et al.*, 2000). Cependant, une étude récente a remis cette base moléculaire en question, démontrant la présence de Kv1.5 et l'absence de Kv3.1 au niveau du ventricule de chien (Fedida *et al.*, 2003).

#### II-2-2-3-1 Sous-unités $\alpha$ impliquées dans la formation du courant $I_K$

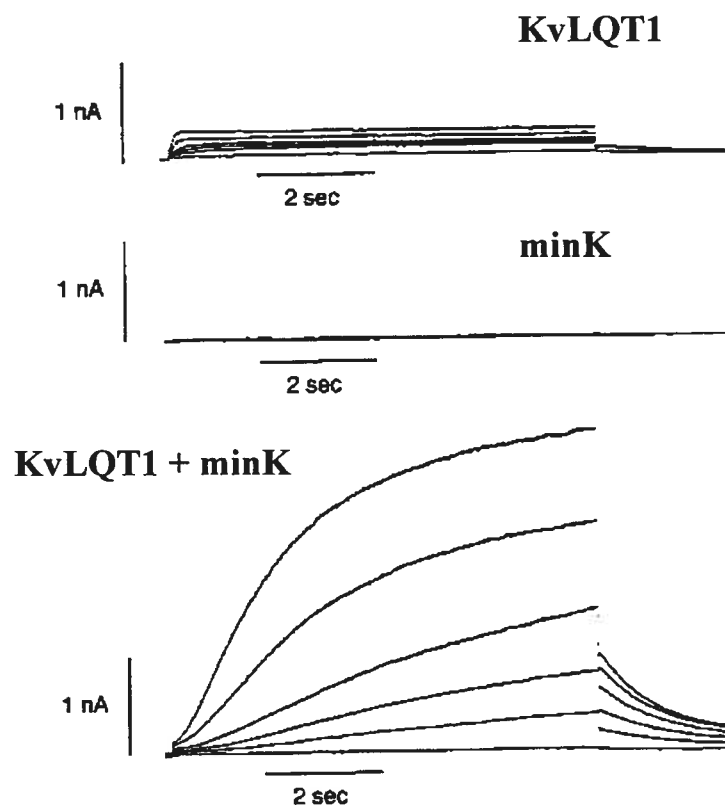
La sous-unité  $\alpha$  ERG est encodée par le gène KCNH2. HERG (l'isoforme humain de ERG) est un polypeptide de 155 kDa sous sa forme mature glycosylée (Gong *et al.*, 2002). Son expression révèle un courant potassique sortant à rectification entrante à des potentiels au delà de 0 mV, ayant des propriétés similaires au courant endogène  $I_{Kr}$ , suggérant que ERG est responsable du courant endogène (Sanguinetti *et al.*, 1996; Trudeau *et al.*, 1995). Ces propriétés inclues la dépendance au voltage de l'activation et de la rectification, la sensibilité aux méthanesulfanilides, et la conduction d'un courant unique de 10 à 12 pS (Hancox *et al.*, 1998; Kiehn *et al.*, 1996; Trudeau *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1998; Zou *et al.*, 1997). Cependant, certaines différences subsistent entre ERG et le courant endogène  $I_{Kr}$  notamment en

terme de « gating » (activation, désactivation) (Abbott *et al.*, 1999), de régulation par des concentrations externes de potassium (McDonald *et al.*, 1997) et de sensibilité aux antiarythmiques (Wang *et al.*, 1997b).

Il a tout d'abord été suggéré que l'association de 2 isoformes de HERG (hétéromultimère) pouvait expliquer en partie les discordances observées (London *et al.*, 1997). Ainsi, l'isoforme 1a a une extrémité N-terminale de 396 acides aminés alors que l'isoforme 1b, plus court a une extrémité N-terminale de 36 acides aminés (London *et al.*, 1997). Cependant, seul l'isoforme 1a peut être détecté au niveau protéique dans le cœur de diverses espèces (Pond *et al.*, 2000), questionnant ainsi l'implication d'hétéromultimères dans le cœur adulte.

L'existence d'une sous-unité modulatrice qui pourrait influencer les propriétés de ERG pour les rendre plus proche du canal endogène  $I_{Kr}$  a été suggérée pour la première fois dans une étude sur une lignée cellulaire d'oreillette de souris (Yang *et al.*, 1995b).

Le gène KCNQ1, codant pour la sous-unité KvLQT1 (tableau 1) a été identifié par du clonage de position lorsque l'on essayait de localiser le gène sur le chromosome 11 responsable de la forme la plus commune de syndrome du QT long inné (Wang *et al.*, 1996a). L'expression de KvLQT1 seule induit un courant retardé de rectification n'ayant aucune relation avec les courants cardiaques décrit jusqu'à présent (figure 7). L'implication d'une sous-unité  $\beta$  modulatrice a donc été suggérée.



**Figure 7 :** KvLQT1 et minK s'assemblent pour former le courant endogène  $I_{Ks}$ . L'expression de KvLQT1 seul dans des cellules CHO (panneau du haut) induit un courant retardé à rectification s'activant rapidement. L'expression de minK seul n'induit pas de courant ionique (panneau du milieu). Lorsque KvLQT1 et minK sont coexprimés, il y a formation d'un courant identique au courant retardé à rectification, cardiaque (modifiée à partir de Sanguinetti *et al.*, 1996).



Une variété d'ADN complémentaire cloné porte le courant  $I_{Kur}$  lorsqu'exprimé dans un système d'expression hétérologue. Ainsi, les sous-unités  $\alpha$  Kv1.2, 1.5, 2.1 et 3.1 portent des courants qui s'activent très rapidement dépendamment du voltage et s'inactivent très lentement. La différence principale entre ces différents clones se situe au niveau de leurs propriétés pharmacologiques. Ainsi, leur sensibilité aux agents tels que le 4-AP, le TEA, la DTX et la CTX permet de les distinguer (Nattel *et al.*, 1999). La sensibilité du courant endogène  $I_{Kur}$  ventriculaire de souris et auriculaire chez l'humain au 4-AP, combiné à sa résistance au TEA et à la DTX pointe la sous-unité Kv1.5 comme principal contributeur à ce courant. Dans l'oreillette de rat,  $I_{Kur}$  est hautement sensible à la DTX, démontrant par le fait même la possible implication de la sous-unité Kv1.2. La sensibilité modérée de  $I_{ss}$  (équivalent à  $I_{Kur}$  chez le rat) au TEA dans le ventricule de rat est compatible avec la sensibilité de Kv2.1 pour le même agent. Finalement, dans l'oreillette chez le chien, la grande sensibilité de  $I_{Kur}$  pour le 4-AP et le TEA indique la possible implication de Kv3.1 (Yue *et al.*, 1996a). Kv3.1 a ensuite été cloné et caractérisé à partir de l'oreillette de chien, confirmant son rôle dans le courant endogène (Yue *et al.*, 2000). L'implication de Kv1.5 dans le courant  $I_{Kur}$  de l'oreillette humaine a été confirmée par l'utilisation d'antisens spécifiques capables d'inhiber l'expression de la sous-unité Kv1.5. Ceci a résulté en la diminution du courant endogène dans des myocytes auriculaires en culture (Feng *et al.*, 1997). Fedida *et al.*, 2003 ont mis en évidence la présence de Kv1.5 au niveau ARNm et protéine chez le chien, alors que Kv3.1 n'a pu être détecté, questionnant ainsi les résultats obtenus par Yue *et al.*, 2000. Les différents anticorps utilisés pourraient expliquer l'absence de détection de Kv1.5 par Yue *et al.* En revanche, il est plus difficile d'expliquer l'absence de détection de Kv3.1 par Fedida *et al.* puisque le même anticorps a été utilisé. Les auteurs parlent de variation intra-espèce dans l'expression des canaux pour expliquer cette différence. Il serait intéressant de confirmer ou d'infirmer les résultats de ces deux groupes afin de clarifier la base moléculaire de  $I_{Kur}$ .

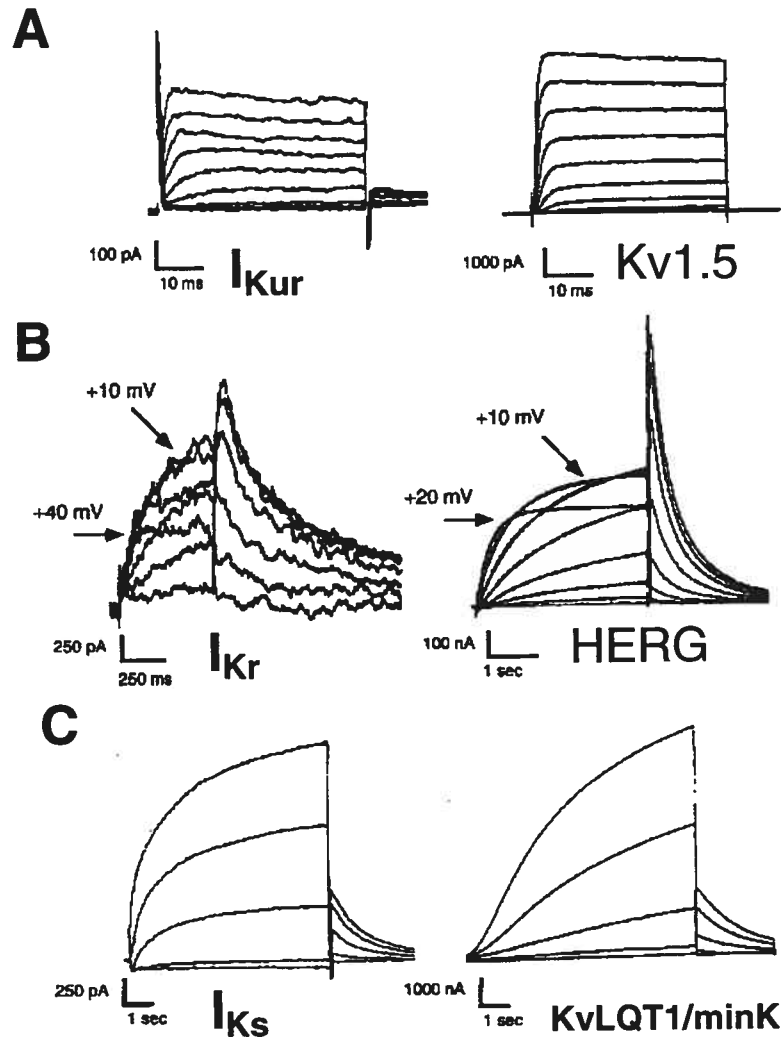
### II-2-2-3-2 Sous-unités $\beta$ impliquées dans la constitution du courant $I_K$ et leur influence sur les sous-unités $\alpha$ HERG et KvLQT1

L'existence d'une sous-unité modulatrice pouvant influencer les propriétés de ERG pour les rendre plus proche du canal endogène  $I_{Kr}$  a été suggérée pour la première fois dans une étude sur une lignée cellulaire d'oreillette de souris (Yang *et al.*, 1995b). C'est ainsi que l'utilisation d'oligonucléotides antisens ciblés contre minK a permis d'observer l'atténuation du courant endogène  $I_{Kr}$  (Yang *et al.*, 1995b). Également, la coexpression de minK et HERG dans des cellules de mammifères CHO a mis en évidence une augmentation du niveau d'expression de HERG à la surface cellulaire (McDonald *et al.*, 1997). Cependant, minK n'affecte pas les propriétés fonctionnelles de HERG mais modifie ses cinétiques d'activation et d'inactivation (McDonald *et al.*, 1997). Du fait de l'association entre HERG et minK, il est possible qu'une protéine de type minK joue un rôle important dans la formation du courant endogène  $I_{Kr}$ .

MiRP1 est une protéine de 123 acides aminés exprimée à partir du gène KCNE2. Il semble que l'effet de MiRP1 sur HERG soit dépendant du système d'expression. MiRP1 s'associe physiquement à la sous-unité HERG lorsque les deux sous-unités sont coexprimées dans les cellules COS (cellules de reins de singe utilisées en culture cellulaire) (Abbott *et al.*, 1999). MiRP1 modifie également certaines propriétés ioniques de HERG quand exprimés dans les œufs de Xénope (Abbott *et al.*, 1999) et les rend plus proches de celles de  $I_{Kr}$ . En effet, MiRP1 ralentit l'activation et déplace le  $V_{1/2}$  de l'activation vers des potentiels plus positifs (Abbott *et al.*, 1999). MiRP1 diminue également l'amplitude du courant porté par HERG de 40% par rapport au courant porté par HERG seul. La vitesse de désactivation ainsi que la conductance unitaire du courant est ralentie par la présence de MiRP1 (Abbott *et al.*, 1999). Dans les cellules HEK, MiRP1 accélère les cinétiques d'activation, de désactivation et d'inactivation du courant porté par HERG. Cependant, dans ces cellules, la dépendance au voltage de l'activation n'est pas perturbée (Mazhari *et al.*, 2002). L'implication de MiRP1 dans le courant  $I_{Kr}$  endogène a été remise en question dans une étude publiée par notre laboratoire. En

effet, la comparaison directe entre le courant  $I_{Kr}$  endogène de cobaye et les courants enregistrés à partir de cellules CHO transfectées avec HERG seul ou avec MiRP1 a permis de démontrer un rôle très limité de MiRP1 dans la formation du courant endogène puisque la présence de MiRP1 n'affectait pas ou peu les propriétés ioniques et pharmacologiques de HERG (Weerapura *et al.*, 2002). Il est démontré que MiRP1 altère également le courant porté par KvLQT1, induisant une courbe courant-voltage linéaire (Tinel *et al.*, 2000). La figure 3 récapitule la base moléculaire des courants retardés à rectification endogènes cardiaques.

MinK a été décrit comme étant le partenaire de KvLQT1 dans le courant  $I_{Ks}$  (Barhanin *et al.*, 1996; Sanguinetti *et al.*, 1996). Il altère ses cinétiques, sa perméabilité et ses propriétés pharmacologiques. La coexpression de minK augmente la densité de courant de KvLQT1 et reproduit ainsi plusieurs caractéristiques du courant endogène  $I_{Ks}$  (Barhanin *et al.*, 1996; Sanguinetti *et al.*, 1996) (figure 8C). Dans les cellules COS, minK ralentit l'activation du canal, altère la dépendance au voltage de l'activation et de l'inactivation et augmente la conductance unitaire du canal. L'amplitude du courant porté par KvLQT1 est au moins deux fois plus importante lorsque minK est présent (Barhanin *et al.*, 1996). Dans les cellules de mammifères et à température physiologique, la coexpression de minK ralentit l'activation de KvLQT1 et déplace sa dépendance au voltage vers des potentiels plus négatifs (Demolombe *et al.*, 1998).



**Figure 8 :** Courants potassiques retardés à rectification enregistrés à partir de myocytes cardiaques et leurs sous-unités clonées respectives. A,  $I_{Kur}$  enregistré à partir de cellules auriculaires humaines (gauche) et Kv1.5 humain exprimé dans des cellules HEK293 à la température de la pièce (23-25°C) (droite). (Modifié à partir de Fedida et al, 1993) B,  $I_{Kr}$  enregistré à partir de cellule ventriculaire de souris néonatales (gauche) et HERG enregistré dans des œufs de Xénope, suite à l'injection de l'ARN correspondant. Il est à noter que l'amplitude du courant diminue lorsque la cellule est dépolarisée à des potentiels supérieurs à 0mV. On remarque également que le courant de queue est plus grand que le courant d'activation. Ceci s'explique par le fait que lorsque la cellule est repolarisée, le canal passe par l'état ouvert beaucoup plus rapidement que sa désactivation permettant une large conduction (figure 7)

(modifié à partir de Wang *et al.*, 1996a et Sanguinetti *et al.*, 1995). C, enregistrement de  $I_{Ks}$  à partir de myocytes ventriculaires de cobaye (gauche) et expression de KvLQT1/minK dans des œufs de Xénope (droite) (modifiée à partir de Sanguinetti *et al.*, 2000).

## II-2-3 Courant potassique sortant à rectification entrante, $I_{K1}$

### II-2-3-1 Description et Rôle physiologique

Le courant potassique à rectification entrante  $I_{K1}$  est responsable du maintien du potentiel de repos ainsi que de la repolarisation tardive du potentiel d'action (fin de la phase 3) (figure 2). Ce canal se comporte comme une diode, permettant le passage d'ions dans le sens entrant lorsque la membrane est hyperpolarisée et empêche la sortie d'ions potassiques lors d'une dépolarisation. Ce mécanisme est appelé rectification entrante et a été décrit pour la première fois dans le muscle squelettique par Katz (Katz, 1949). Cette rectification est particulièrement importante dans les cellules cardiaques car elle empêche la perte excessive d'ions potassiques intracellulaires lors de la période de dépolarisation du plateau.  $I_{K1}$  est plus petit dans les cellules auriculaires que dans les cellules ventriculaires, expliquant ainsi le potentiel diastolique maximum auriculaire moins négatif et la phase de repolarisation (phase 3) plus lente (Giles & Imaizumi, 1988; Wang *et al.*, 1998). La rectification rentrante de  $I_{K1}$  est très marquée, permettant au canal de porter un courant substantiel à des potentiels négatifs et de conserver un potentiel de repos stable. Physiologiquement, seul le courant sortant joue un rôle car il apparaît à des potentiels plus positifs que -90 mV (potentiel inverse du potassium). En effet, le potentiel membranaire des myocytes cardiaques n'atteint jamais des potentiels plus négatifs que le potentiel inverse du potassium (Nerbonne & Kass, 2003). Lors d'une dépolarisation, le canal n'est plus capable de conduire de courant du fait de la forte rectification. Ceci limitant le rôle de  $I_{K1}$  durant la phase de plateau. La rectification de ce canal se traduit par le blocage du courant sortant par des composants intracellulaires.

Dans le cas d' $I_{K1}$ , la présence de  $Mg^{2+}$  est suffisante pour expliquer la rectification du courant endogène. Lorsque la cellule se repolarise, le canal se retrouve de nouveau dans un état conducteur et contribue ainsi à la repolarisation puis stabilisation du potentiel de repos (Lopatin & Nichols, 2001). La suppression de  $I_{K1}$  ventriculaire chez le cobaye par transfert génique produit un phénotype similaire à celui observé dans les cellules pacemaker (Miake *et al.*, 2002). En effet, la suppression de 80% du courant  $I_{K1}$  permet aux cellules de générer une excitation à cause de la dépolarisation du potentiel membranaire (Miake *et al.*, 2002).

### II-2-3-2 Base moléculaire

Kir2.1 est la sous-unité portant le courant  $I_{K1}$  la plus abondante au niveau ARN messenger dans les oreillettes et ventricules et est exprimée de façon égale dans les deux tissus (Wang *et al.*, 1998). Elle est constituée de deux segments transmembranaires et d'un pore unique. Cette sous-unité porte un courant ayant la plupart des caractéristiques du courant endogène. La conductance de la sous-unité Kir2.1 est très proche de celle du courant endogène chez le cobaye (Sakmann & Trube, 1984) et chez le rat (Burnashev & Zilberter, 1986). L'utilisation d'antisens a permis de démontrer l'importance de Kir2.1 dans la formation de  $I_{K1}$  dans les ventricules de rat (Nakamura *et al.*, 1998). Également, la production de souris transgéniques Kir2.1<sup>-/-</sup> a permis de confirmer l'importance de Kir2.1 dans le courant endogène puisque celui-ci est absent dans les myocytes ventriculaires de ces souris (Zaritsky *et al.*, 2001). Les souris Kir2.2<sup>-/-</sup> montrent quant à elles une diminution du courant endogène ventriculaire  $I_{K1}$  moins radicale impliquant aussi un rôle pour cette sous-unité dans la composition du canal endogène (Zaritsky *et al.*, 2001). Il apparaît donc que les deux sous-unités  $\alpha$  Kir2.1 et Kir2.2 jouent un rôle dans la formation du courant endogène. De plus, des expériences biochimiques et électrophysiologiques sur des myocytes cardiaques supportent la théorie selon laquelle le canal  $I_{K1}$  est formé par un hétérotétramère de différentes sous-unités Kir2 (Schram *et al.*, 2003).

## II-2-4 Les canaux potassiques à rectification entrante couplés aux protéine G

### II-2-4-1 Courant sensible à l'acétylcholine, $I_{KACH}$

#### II-2-4-1 Description et rôle physiologique

Certains canaux potassiques sont couplés aux protéines G et sont régulés par l'activation d'un récepteur. C'est le cas des canaux potassiques à rectification entrante  $I_{KACH}$ , qui sont couplés au récepteur muscarinique M2. Lors d'une stimulation parasympathique, il y a relâche d'acétylcholine et la fréquence cardiaque diminue suite à l'activation des récepteurs muscariniques M2. Ceci a pour effet, outre de réduire l'activation du courant pacemaker  $I_f$ , d'activer les canaux muscariniques  $I_{KACH}$  au niveau du nœud sinusal et de l'oreillette, provoquant l'hyperpolarisation de la membrane. Le potentiel membranaire est alors plus négatif, rendant le seuil d'activation du potentiel d'action plus long à être atteint (Snyders, 1999).

#### II-2-4-1-2 Base moléculaire

$I_{KACH}$  est constitué des sous-unités de la famille Kir3.x. Plusieurs cDNA (Kir3.1-3.5) (Dascal *et al.*, 1993) exprimant ces canaux ont été clonés et toutes les sous-unités partagent une structure primaire similaire, soit celle retrouvée pour les sous-unités Kir2.x (deux segments transmembranaires M1 et M2 séparés par la région formant le pore).  $I_{KACH}$  est constitué par la formation d'un complexe hétérotétramérique de deux sous-unités Kir3.1 associées à deux sous-unités Kir3.4 au niveau de l'oreillette (Corey *et al.*, 1998)

## II-2-4-2 Courant sensible à l'ATP, $I_{KATP}$

### II-2-4-2-1 Description et rôle physiologique

$I_{KATP}$  joue un rôle de protection lors de stress métabolique en liant le potentiel membranaire à l'état métabolique de la cellule : En effet, les canaux  $I_{KATP}$  sont inhibés par des niveaux intracellulaires d'ATP physiologiques, mais s'ouvrent lorsque le niveau d'ATP diminue. Il régule également la sécrétion d'insuline et l'excitation cardiaque (Dascal, 1997). Sa rectification est moins prononcée que celle de  $I_{K1}$ . Dans les myocytes ventriculaires, il a été suggéré que l'activation de  $I_{KATP}$  joue un rôle dans le raccourcissement du potentiel d'action cardiaque ainsi que dans la perte d'ions potassiques ayant lieu dans divers états pathologiques, incluant l'ischémie et l'hypoxie qui sont associées à un stress métabolique ou à une altération du métabolisme (Findlay, 1994).

### II-2-4-2-2 Base moléculaire

Il est établi que le canal  $I_{KATP}$  est formé d'un complexe hétéro multimérique contenant 4 sous-unités Kir6.2 (2 segments transmembranaires) et une sous-unité auxiliaire (contenant le site de liaison pour l'ATP) SUR (récepteur au sulfonylurée) (Inagaki *et al.*, 1995). L'implication de Kir6.2 dans  $I_{KATP}$  a été démontré par l'étude de souris transgénique Kir6.2<sup>-/-</sup>. Ces souris ne présentent pas de courant  $I_{KATP}$  endogène (Suzuki *et al.*, 2001). De la même façon, des souris SUR2<sup>-/-</sup> montrent une réduction dans la densité du canal endogène (Pu *et al.*, 2001).



Sous-unité	Gène	Courant natif correspondant	Fonction physiologique	Modulateurs pharmacologiques
Kv4.2/Kv4.3	KCND2/KCND3	I <sub>to</sub> (sous-unité $\alpha$ ) Composante rapide	Repolarisation rapide (phase 1)	4-AP, PaTX
Kv1.4	KCNA4	I <sub>to</sub> (sous-unité $\alpha$ ) Composante lente	Repolarisation rapide (phase 1)	
KChIP2	KCNIP2	I <sub>to</sub> (sous-unité $\beta$ )	Nécessaire à la formation de I <sub>to</sub>	
ERG	KCNH1	I <sub>Kr</sub> (sous-unité $\alpha$ )	Repolarisation, phase 3	E-4031, dofetilide
MiRP1	KCNE2	Module I <sub>Kr</sub> , I <sub>to</sub> , I <sub>f</sub>	?	
KvLQT1	KCNQ1	I <sub>Ks</sub> (sous-unité $\alpha$ )	Repolarisation phase 3 (surtout suite à une stimulation $\beta$ -adré et inhibition de I <sub>Kr</sub> )	Chromanol-293B, HMR1556
MinK	KCNE1	I <sub>Ks</sub> (sous-unité $\beta$ )	Forme I <sub>Ks</sub> avec KvLQT1	
Kv1.5	KCNA5	I <sub>Kur</sub>	Repolarisation phase 1-2	4-AP ( $\mu$ M), Clofilium
Kv3.1	KCNC1	I <sub>Kur</sub>	Repolarisation phase 1-2	4-AP ( $\mu$ M), TEA (mM)
Kir2.1	KCNJ2	I <sub>K1</sub>	Potentiel de repos, phase terminale de la repolarisation	Ba <sup>2+</sup> , spermine, Mg <sup>2+</sup>
Kir3.1/3.4	KCNJ3/KCNJ4	I <sub>KACH</sub>	Médie les effets de l'acétylcholine	Ba <sup>2+</sup> , Cs <sup>+</sup>

**Tableau 2 :** Classification des différents canaux potassiques impliqués dans le potentiel d'action cardiaque (modifié à partir de Schram *et al.*, 2002b)

### II-3 Mécanismes d'inactivation des canaux potassiques

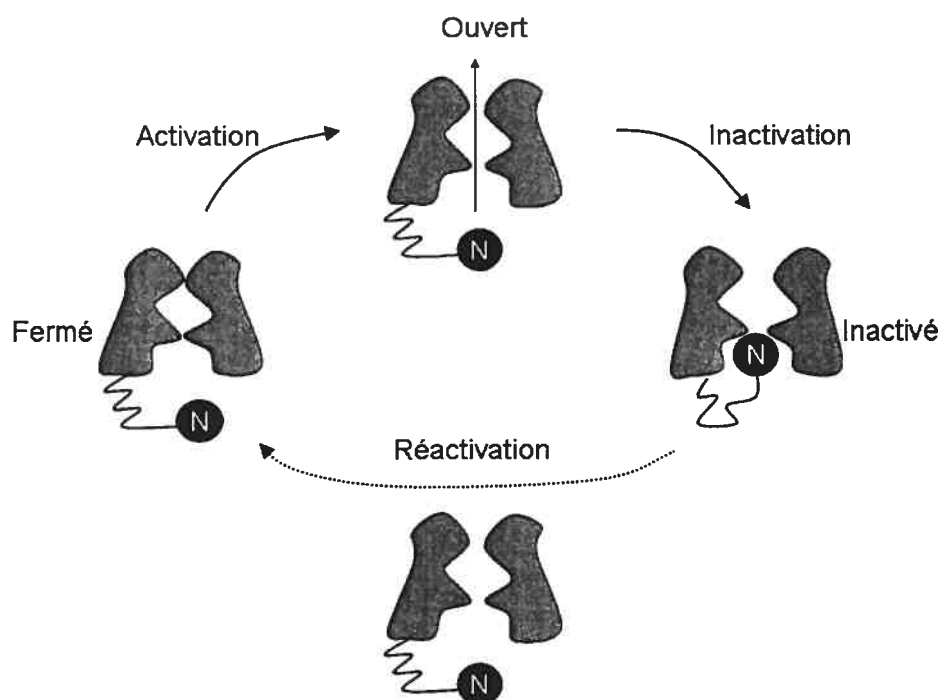
Suite à une dépolarisation de la membrane cellulaire, les canaux potassiques dépendants du voltage sont activés et rentrent dans une conformation ouverte leur permettant de conduire un courant. Suivant cet état conducteur, le canal passe dans une conformation non conductrice appelée inactivation. Ce mécanisme est important dans le fonctionnement du courant transitoire sortant  $I_{to}$  et du courant retardé sortant à rectification entrante  $I_{Kr}$ . En effet, il permet au courant  $I_{to}$  de remplir son rôle dans la repolarisation rapide du potentiel d'action cardiaque ( $I_{to}$ , une fois inactivé n'a plus d'influence sur la repolarisation tardive) et à  $I_{Kr}$  de jouer un rôle dans la repolarisation tardive du potentiel d'action (son inactivation rapide le place dans un état non conducteur lors des phases initiales du potentiel d'action). Il existe principalement deux mécanismes d'inactivation distincts. Le mécanisme d'inactivation de type N met en jeu l'extrémité N-terminal du canal alors que l'inactivation de type C implique des résidus dans la région du pore.

#### II-3-1 Inactivation classique de « type N »

Ce type d'inactivation répond au mécanisme « Ball and Chain » (Hoshi *et al.*, 1990; Zagotta *et al.*, 1990). Ce mécanisme est similaire à celui décrit pour la première fois chez le canal sodique de l'axone de calamar (Armstrong, 1971). Le mécanisme moléculaire de l'inactivation de type N a été décrit pour la première fois dans le canal potassique de type *Shaker B* (Hoshi *et al.*, 1990; Zagotta *et al.*, 1990). Il met en jeu un regroupement d'acides aminés au niveau de l'extrémité N-terminale du canal. La « balle » ainsi formée vient obstruer la partie interne du pore pour rendre le canal dans un état non conducteur ou inactivé (figure 9). Malgré le faible niveau d'homologie entre les différents canaux potassiques dans l'extrémité N-terminale, ce mécanisme a été rapporté dans plusieurs canaux tels que Kv1.4 et Kv3.4 (Ruppertsberg *et al.*, 1991a; Ruppertsberg *et al.*, 1991b).

Le processus d'inactivation de type N est très rapide (de l'ordre de la milliseconde) et fait donc référence à l'inactivation rapide. Plusieurs évidences ont permis d'expliquer le principe de ce mécanisme. Ainsi, l'inactivation rapide du canal est éliminée suite à la délétion de l'extrémité N-terminale (Hoshi *et al.*, 1990; Zagotta *et al.*, 1990). Elle est restaurée par l'ajout d'un peptide synthétique exogène, dont la composition est basée sur la partie N-terminale. Du fait de l'action intracellulaire de la balle, qui vient se fixer sur un domaine interne du pore, certains agents pharmacologiques tels que le TEA rentre en compétition avec cette balle pour un site de liaison proche l'un de l'autre. Par conséquent, la présence de TEA intracellulaire ralentie le développement de l'inactivation rapide (Choi *et al.*, 1991; Demo & Yellen, 1991). Par contre la présence du même agent du côté extracellulaire n'a pas d'effet sur l'inactivation rapide (Lopez-Barneo *et al.*, 1993; Rasmusson *et al.*, 1995). Le passage d'ions potassium de l'extérieur vers l'intérieur provoque « l'éjection » de la balle de son site de liaison résultant en l'accélération de la réactivation après inactivation en présence d'une concentration élevée de potassium (Demo & Yellen, 1991).

L'inactivation de type N est insensible à la mutation de résidus acides aminés localisés au niveau de la partie externe du pore ou dans la région du segment transmembranaire S6 (Hoshi *et al.*, 1990; Lopez-Barneo *et al.*, 1993; Rasmusson *et al.*, 1995). L'inactivation de type-N emprisonne le canal dans un état ouvert et l'empêche de se refermer. Lorsque la cellule se repolarise, les canaux s'inactivant par l'inactivation de type-N possèdent un courant de queue proéminent dans des conditions où la concentration extracellulaire de potassium est importante, indiquant que la réactivation après inactivation s'effectue en passant par l'état ouvert (Demo & Yellen, 1991; Ruppersberg *et al.*, 1991a).



**Figure 9** : Description schématique du mécanisme d'inactivation de type N. Suite à une dépolarisation, le canal passe de l'état fermé (repos) à l'état ouvert, état dans lequel les ions peuvent passer librement à travers le pore. Le canal rentre ensuite dans un état non conducteur ou inactif. Le procédé par lequel le canal retrouve son état initial, soit le passage de l'état inactif à l'état fermé est appelé réactivation.

### II-3-2 Inactivation classique de « type C »

Lorsque l'extrémité N-terminale est éliminée, une inactivation plus lente persiste. Elle est appelée inactivation de type C par opposition à celle impliquant l'extrémité N-terminale et a été décrite dans le canal *Shaker* (Pongs, 1992). En fait, les résidus impliqués se situent dans la partie extracellulaire du sixième segment transmembranaire. L'inactivation de type-C n'implique pas un mécanisme de type « ball and chain » comme l'inactivation de type-N mais plutôt un changement de conformation de la partie externe du pore menant à la constriction et la fermeture de

celui-ci (Yellen *et al.*, 1994). Les ions potassium, en se liant à un site de liaison interne entrent en compétition avec le mécanisme d'inactivation. Ainsi, l'inactivation de type-C est ralentie lorsque la concentration d'ions potassium extracellulaire est augmentée (Lopez-Barneo *et al.*, 1993) et lorsque l'on applique du TEA au niveau extracellulaire (Choi *et al.*, 1991), suggérant une compétition entre l'ion potassium, le TEA et le site responsable de l'inactivation de type-C.

Par ailleurs, l'inactivation de type-C est couplée à l'activation. La réactivation après l'inactivation de type-C de Kv1.4 gouverne l'ensemble de la réactivation de Kv1.4 (Rasmusson *et al.*, 1995). Des bloqueurs internes de canaux potassiques augmente le niveau d'inactivation de type-C en empêchant le flux sortant d'ions potassium (Choi *et al.*, 1991).

HERG s'inactive par un mécanisme proche de celui décrit pour l'inactivation de type-C. Ainsi, l'inactivation de HERG est sensible au TEA extracellulaire et à des mutations proches de la partie extracellulaire dans la région du pore (Schonherr & Heinemann, 1996; Smith *et al.*, 1996). Cependant, certaines propriétés de l'inactivation de HERG sont distinctes de celles décrites par l'inactivation de type-C. En effet, la vitesse de réactivation après l'inactivation de type-C augmente généralement avec une augmentation de la concentration extracellulaire de potassium (Levy & Deutsch, 1996; Rasmusson *et al.*, 1995). Au contraire, le taux de réactivation après l'inactivation de HERG diminue avec une augmentation de potassium extracellulaire (Wang *et al.*, 1997b). Alors que le développement de l'inactivation de type-C est insensible au voltage à des potentiels positifs au seuil d'activation (Rasmusson *et al.*, 1995), l'inactivation de HERG est dépendante du voltage à de tels potentiels (Rasmusson *et al.*, 1998). Finalement, HERG se réactive rapidement après l'inactivation, ce qui va à l'encontre des mécanismes de l'inactivation de type-C (Schonherr & Heinemann, 1996; Smith *et al.*, 1996; Spector *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996b).

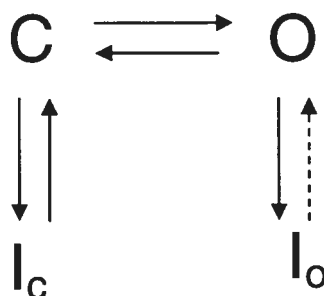
Comme décrit précédemment, Kv4.2 et Kv4.3 constituent la base moléculaire du courant transitoire sortant  $I_{to}$ . Tous les membres de la famille Kv4 s'inactivent rapidement et sont relativement insensibles à l'élimination de l'extrémité N-terminale (Zhu *et al.*, 1999). Ainsi, les premières études décrivant les mécanismes d'inactivation des canaux Kv4 ont adopté le terme d'inactivation de type-C (Sheng *et*

*al.*, 1992). Cependant, comme HERG, les membres de la famille Kv4 ont la capacité de se réactiver rapidement. Les résidus situés dans la région du pore et dans la partie extracellulaire du segment S6, important dans la détermination de l'inactivation de type-C dans les canaux Shaker et Kv1.4 n'apparaissent pas comme étant consistant avec une inactivation de type-C de Kv4 (Rasmusson *et al.*, 1998). Par conséquent, le terme d'inactivation de type-C a été reconsidéré pour les canaux de la famille Kv4.

### II-3-3 Autres formes d'inactivation

Ainsi, il est généralement suggéré que les canaux potassiques de la famille Kv4 s'inactivent par un mécanisme propre, impliquant l'action concertée des extrémités N- et C-terminales (Jerng & Covarrubias, 1997).

Il a été démontré que les canaux Kv4 s'accumulent dans un état fermé inactivé ( $I_C$ ) lors d'une dépolarisation prolongée après avoir occupé transitoirement un état ouvert inactivé ( $I_O$ ) (Bähring *et al.*, 2001a; Jerng *et al.*, 1999). En fait, l'inactivation de Kv4 s'expliquerait par de nombreuses transitions entre l'état fermé, ouvert et inactivé (figure 10). Ainsi, les canaux peuvent s'inactiver directement à partir de l'état fermé ( $C \rightarrow I_C$ ), avant d'entrer dans l'état ouvert. Du fait de son instabilité, l'état ouvert peut être retourné à l'état fermé puis à l'état inactivé fermé ( $O \rightarrow C \rightarrow I_C$ ). D'un autre côté, l'état ouvert peut être suivi par un état transitoire inactivé ouvert ( $O \rightarrow I_O$ ). Par conséquent, les principales caractéristiques de ce modèle sont le passage transitoire du canal dans un état inactivé ouvert et son accumulation finale dans un état inactivé fermé (Bähring *et al.*, 2001a; Jerng *et al.*, 1999). Ce type de modèle explique la raison pour laquelle la réactivation après inactivation ne passe pas par l'état ouvert du canal (Bähring *et al.*, 2001a). De plus, le fait que les cinétiques d'inactivation soit insensible au TEA intracellulaire et que la réactivation après inactivation soit ralentie en présence de haute concentration de potassium externe (Jerng & Covarrubias, 1997) laisse à penser que les mécanismes d'inactivation de Kv4 diffèrent de ceux déjà décrits pour les canaux de la famille Shaker.



**Figure 10:** Mécanisme d'inactivation simplifié des sous-unités Kv4. Diagramme montrant l'état fermé (C), ouvert (O), ouvert inactivé (I<sub>O</sub>), fermé inactivé (I<sub>C</sub>). Suite à l'ouverture du canal, il est suggéré que les canaux Kv4 occupent transitoirement un état ouvert inactivé (I<sub>O</sub>), se fermant ensuite pour s'accumuler dans un état fermé inactivé (I<sub>C</sub>).

Cependant, ce concept a été remis en cause par Eghbali et al qui ont présenté des résultats montrant un écroulement de la partie externe du pore précédé par la déstabilisation de l'état conducteur du canal suite à une diminution d'ions potassiques. Ceci étant consistant avec une inactivation de type-C (Eghbali *et al.*, 2002). La plupart des études sur l'inactivation de la famille Kv4 ont été faites sur Kv4.1. Il apparaît maintenant que Kv4.2 répond à un mécanisme distinct de celui de Kv4.1 et que, malgré les différences structurales, Kv4.2 et Kv1.4 n'ont pas un mécanisme d'inactivation si lointain. Il a été montré récemment que l'extrémité N-terminale de Kv4.2 était capable de produire une inactivation rapide sur un canal s'inactivant lentement (Kv2.1) avec des propriétés similaires à celles décrites pour l'inactivation de type-N (Gebauer *et al.*, 2004). En effet, plusieurs caractéristiques de l'inactivation de cette protéine chimérique suggèrent une inactivation de type-N (due à la présence de l'extrémité N-terminale de Kv4.2). Ainsi, la présence de TEA intracellulaire ralentit l'inactivation rapide de la protéine chimérique; la réactivation après l'inactivation passe par l'état ouvert du canal comme dans le cas des canaux de la famille *Shaker*; une importante concentration de potassium extracellulaire accélère la réactivation après inactivation du canal; la partie N-terminale du canal (peptide synthétique), lorsque ajouté à la solution externe dans des conditions de patch clamp

en configuration « inside out » (Gebauer *et al.*, 2004). Contrairement à Kv1.4 et Shaker, la famille Kv4 possède un mécanisme d'inactivation complexe qui demande toujours à être clarifié.

#### **II-3-4 Inactivation fonctionnelle des courants à rectification entrante**

Alors que la rectification entrante observée chez HERG est due à l'inactivation du canal tel que décrit précédemment, celle présente chez les sous-unités Kir2 portant le courant  $I_{K1}$  s'explique par l'action bloquante de cations divalents et de polyamines. Armstrong fut le premier à suggérer l'action bloquante du canal par des cations divalents au niveau du pore (Armstrong, 1969). Ce n'est qu'à la fin des années 80 que fut démontré l'implication des ions  $Mg^{2+}$  dans le phénomène de rectification du canal (Matsuda *et al.*, 1987). Cependant, l'action du magnésium n'était pas suffisante pour expliquer la forte rectification. De plus, en absence de  $Mg^{2+}$ , la rectification était dans la plupart du temps toujours présente (Martin *et al.*, 1995; Oliva *et al.*, 1990). Finalement, il a été mis en évidence qu'une famille de cations organiques intracellulaire appelés polyamines était responsable du bloc dépendant du voltage du canal (rectification) (Fakler *et al.*, 1994; Fakler *et al.*, 1995; Ficker *et al.*, 1994; Lopatin *et al.*, 1994). La spermine et la spermidine sont des polyamines provoquant un bloc plus important que le magnésium (Lopatin *et al.*, 1995). L'action des polyamines dépend de la présence de résidus acides aminés chargés négativement (D172 et E224) situés dans le domaine M2, proche de l'extrémité C-terminale (Yang *et al.*, 1995a). Le site d'action précis des polyamines n'est pas encore connu mais plusieurs études suggèrent l'importance du filtre de sélectivité (Doyle *et al.*, 1998; Guo & Lu, 2000; Lopatin *et al.*, 1995).

#### **II-4 Variations dans l'expression des canaux potassiques**

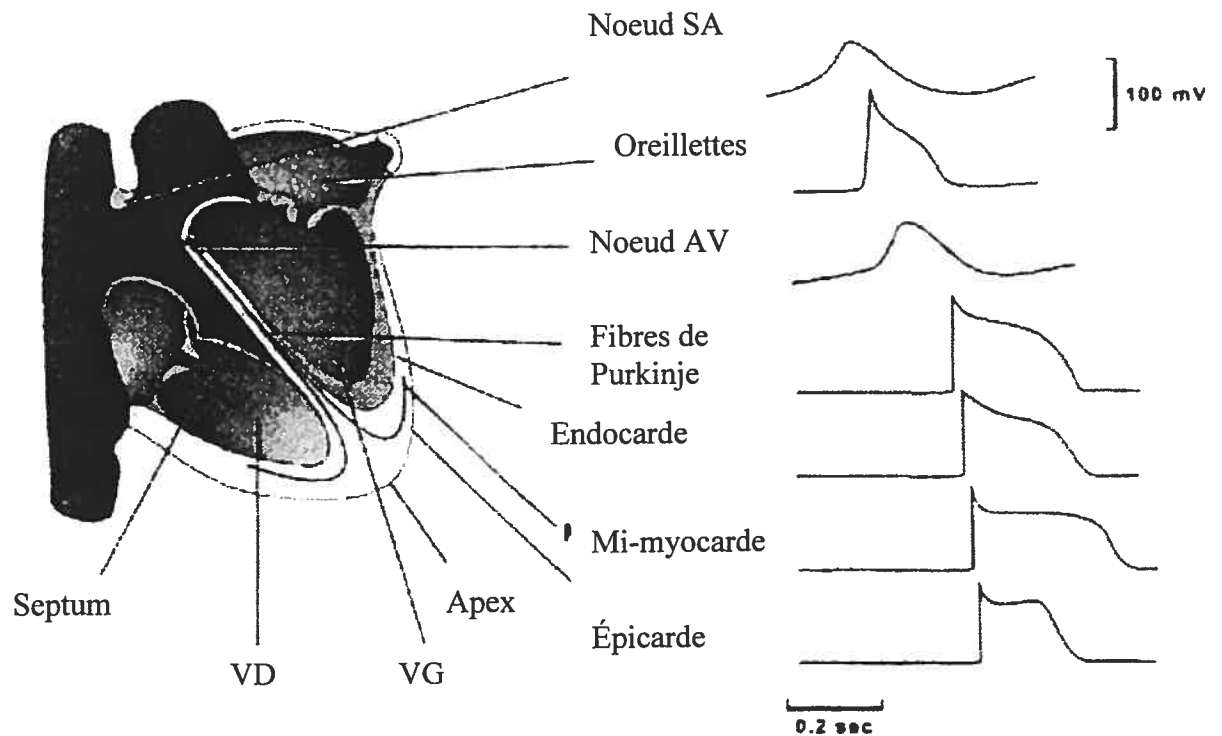
La fonction cardiaque est assurée par une séquence temporelle de contractions dans les différentes régions du tissu cardiaque ainsi que par un rythme cardiaque approprié. Afin de favoriser cette fonction, l'activité électrique de chaque



région doit être adaptée à la spécificité de sa fonction. Par conséquent, une activité cardiaque sous contrôle dépend des propriétés spécifiques de chaque région telle que le nœud sinusal, les oreillettes, le nœud auriculo-ventriculaire, le système His-Purkinje et les ventricules.

La fonction cardiaque est également dépendante de la taille du cœur et par conséquent de l'espèce. À titre d'exemple, la configuration du potentiel d'action chez la souris est différente de celle du potentiel d'action chez l'humain, suggérant des différences spécifiques à l'espèce dans l'expression et/ou dans le rôle fonctionnel de chaque courant potassique au niveau individuel. La souris possède un rythme cardiaque de base très élevé comparé à celui de l'humain, impliquant des besoins physiologiques propres. La durée du potentiel d'action est très courte chez le rongeur due à l'influence de courants potassiques qui ont un effet moindre sur le potentiel d'action humain (notamment  $I_{to}$ ). La variation de la base moléculaire des canaux potassiques selon les régions et les espèces permet donc de mieux comprendre la spécialisation de ces régions et leur rôle dans la fonction cardiaque.

Les différences ioniques selon la région sont non seulement le reflet des différentes morphologies de potentiel d'action (figure 11) mais aussi de la réponse aux agents pharmacologiques et aux états pathophysiologiques.



**Figure 11 :** Variabilité du potentiel d'action selon la région. Représentation schématique du cœur, forme des potentiels d'action enregistrés dans les différentes régions. Les potentiels d'action sont présentés dans l'ordre de la conduction électrique à travers le cœur (modifié à partir de Nerbonne, 2000).

## II-4-1 Variations de l'expression selon la région et l'espèce

### II-4-1-1 Le courant transitoire sortant, $I_{to}$

Le gradient d'expression du courant transitoire sortant dans les différentes couches du ventricule constitue un exemple de variation d'expression des canaux potassiques, dépendant de la spécificité électrophysiologique du tissu. Ainsi, le gradient transmural dans la distribution de  $I_{to}$  contribue directement au gradient de potentiel mesuré à travers la paroi ventriculaire, induisant alors une hétérogénéité dans la repolarisation ventriculaire, responsable de l'onde J sur l'électrocardiogramme.  $I_{to}$  possède une base moléculaire variable selon l'espèce ainsi qu'un niveau d'expression de ses sous-unités dépendant de la localisation cellulaire

L'expression du courant  $I_{to}$  ainsi que sa composition moléculaire n'est pas uniforme dans le cœur et dépend de l'espèce (tableau 3). Des variations existent entre les différentes régions d'un même tissu. Ainsi, l'expression de  $I_{to}$  varie à travers les différentes couches qui constituent la paroi du ventricule. La densité de  $I_{to,f}$  est importante dans les cellules épicrodiques du ventricule gauche chez l'humain (Nabauer *et al.*, 1996), chez le furet (Brahmajothi *et al.*, 1999), ainsi que dans les cellules apicales de la souris (Xu *et al.*, 1999a). De son côté,  $I_{to,s}$  est exprimé dans les cellules endocardiennes du ventricule gauche chez l'humain (Nabauer *et al.*, 1996), chez le furet (Brahmajothi *et al.*, 1999) ainsi que dans les cellules du septum chez les rongeurs (Wickenden *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 1999a). Il est intéressant de faire le lien entre la distribution des courants endogènes et les sous-unités qui les composent. Ainsi, les sous-unités Kv4.2 et Kv4.3 au niveau ARN messager et protéique sont toutes deux exprimées dans le ventricule de rat et sont donc des candidats pour la formation du courant endogène (Shimoni *et al.*, 1997; Fiset *et al.*, 1997b; Wickenden *et al.*, 1999). Dans la paroi ventriculaire gauche, le niveau d'expression d'ARNm de Kv4.2 suit le gradient d'expression du courant transitoire sortant endogène, soit une densité de courant plus importante dans l'épicrode que dans l'endocarde (Wickenden *et al.*, 1999). Au contraire, les sous-unités Kv1.4 et Kv4.3 sont exprimées uniformément à travers la paroi (Wickenden *et al.*, 1999). L'ARNm de ces trois sous-unités est également détecté aussi bien dans la paroi du ventricule droit qu'au

niveau du septum, avec une expression plus importante au niveau de la paroi du ventricule droit. La différence d'expression des sous-unités reflète la présence des 2 composantes du courant transitoire sortant dans les différentes régions du ventricule. En effet, on retrouve les ARN messagers de Kv4.2 et Kv4.3 en plus grande quantité dans l'épicaarde que dans l'endocarde expliquant la présence de la composante rapide de  $I_{to}$  ( $I_{tof}$ ) dans cette région. Par contre, la sous-unité Kv1.4 est exprimée en plus grande quantité dans l'endocarde, expliquant la présence de la composante lente de  $I_{to}$  ( $I_{tos}$ ) dans cette région (Nerbonne, 2000)

Dans le ventricule de furet, on retrouve aussi le gradient transmural de  $I_{to}$  qui est également dû à une expression importante de Kv1.4 au niveau de l'endocarde alors que l'on retrouve une prédominance de Kv4.2/4.3 dans l'épicaarde (Wickenden *et al.*, 1999).

Dans les cellules auriculaires de lapin, on retrouve la sous-unité Kv1.4. La présence de cette dernière contribue possiblement aux différences observées au niveau du courant  $I_{to}$  natif entre l'humain et le lapin (Wang *et al.*, 1999).

Par ailleurs le gradient de courant  $I_{to}$  ne peut être expliqué par un gradient d'expression de la sous-unité Kv4.3 chez l'humain puisque celle-ci y est exprimée uniformément au niveau de l'ARN messenger (Rosati *et al.*, 2001). Or, l'existence d'un gradient de KCHIP2 retrouvé au niveau de l'ARN messenger et protéique chez l'humain pourrait expliquer le gradient du courant endogène (Rosati *et al.*, 2003). En effet, le gradient d'expression de KCHIP2 suivrait celui du courant  $I_{to}$  endogène, soit une expression plus importante dans la région épicaardique qu'endocardique (Rosati *et al.*, 2003).

Cependant ce concept a été remis en cause par Deschênes et al, 2002 qui ont mesuré un niveau d'expression constant de la protéine KCHIP2 dans les différentes couches ventriculaire. Cette discordance tient possiblement d'une technique limitée puisque les deux groupes utilisent des anticorps différents.

#### II-4-1-2 Le courant retardé sortant à rectification, $I_K$ .

La densité de  $I_{Ks}$  et  $I_{Kr}$  ventriculaire est également variable. Par exemple, chez le chien, la densité de  $I_{Ks}$  est plus importante dans les cellules épicaardiques et

endocardiques que dans les cellules M (mi-myocarde) (Liu & Antzelevitch, 1995). Il existe également des différences régionales dans l'expression de  $I_{Kr}$  et  $I_{Ks}$  dans le ventricule gauche chez le cobaye (Bryant *et al.*, 1998; Main *et al.*, 1998). Le courant potassique sortant de rectification  $I_K$  est plus grand dans les cellules subépicardiques que subendocardiques. Ceci peut s'expliquer par l'augmentation de  $I_{Kr}$  dans ces cellules (Main *et al.*, 1998).

Les différences dans l'expression des courants  $I_{Kr}$  et  $I_{Ks}$  contribuent à l'hétérogénéité du potentiel d'action enregistré dans les différentes régions (droit vs gauche; apex vs base) et dans les différentes couches (épicarde vs mi- myocarde vs endocarde) du ventricule (Antzelevitch *et al.*, 1991; Bryant *et al.*, 1998; Liu & Antzelevitch, 1995; Main *et al.*, 1998).

Espèces	Tissu	Sous-type	Clone	Distribution des différents clones	Densité du Courant endogène
Souris	Oreillette	I <sub>tof</sub>	Kv4.2/4.3		O<V
	Ventricule	I <sub>tof</sub>	Kv4.2/4.3	Epi>Endo	Epi>Endo
		I <sub>tos</sub>	Kv1.4	Endo>Epi	Apex>Base
Rat	Oreillette	I <sub>tof</sub>	Kv4.2/4.3	O>V	O>V
	Ventricule	I <sub>tof</sub>	Kv4.3/4.3	VD>septum	Epi>Endo PVG>Septum
		I <sub>tos</sub>	Kv1.4		
Lapin	Oreillette	I <sub>tos</sub>	Kv1.4		
	Ventricule	I <sub>tos</sub>	Kv4.2	Epi>Endo	Epi>Endo
				Kv1.4	
Chien	Oreillette	I <sub>tof</sub>			
	Ventricule	I <sub>tof</sub>	Kv4.3	Epi>Endo	Epi>Endo
		I <sub>tos</sub>	Kv1.4	Endo>Epi	
Furet	Oreillette	?	Kv4.2	OD, OG	
			Kv4.3	OD>OG	
			Kv1.4	OD, OG	
	Ventricule	I <sub>tof</sub>	Kv4.2	Epi, VD	Epi>Endo
			Kv4.3	Epi apical	
	I <sub>tos</sub>	Kv1.4	Endo apical		
Humain	Oreillette	I <sub>tof</sub>	Kv4.3		
	Ventricule	I <sub>tof</sub>	Kv4.3		Epi>Endo
		I <sub>tos</sub>	Kv1.4		

**Tableau 3:** Composition moléculaire et propriétés du courant transitoire sortant chez différentes espèces (modifié à partir de Oudit *et al.*, 2001).

L'expression de minK est plus importante dans le nœud sinusal que dans les oreillettes et ventricules. Un système utilisant l'expression de la beta-galactosidase comme marqueur, permettant la visualisation de minK a montré qu'il était exprimé dans tout le système de conduction chez la souris adulte (Kupersmidt *et al.*, 1999). Ce système n'a révélé aucun signal au niveau ventriculaire. Les niveaux d'ARNm de minK dans les différentes couches du ventricule chez l'humain ne varient pas (Pereon *et al.*, 2000). KvLQT1 est exprimé dans 70% des myocytes auriculaires et ventriculaires et dans 50 à 60% des cellules des autres régions (Brahmajothi *et al.*, 1996; Freeman & Kass, 1993).

$I_{Kr}$ , chez le cobaye est plus petits dans les cellules endocardiques qu'épicardiques ou dans les cellules du mi myocarde (Bryant *et al.*, 1998) expliquant une durée du potentiel d'action plus longue dans cette région (Main *et al.*, 1998).

Par ailleurs, un courant  $I_{Ks}$  de faible densité s'associe à une durée du potentiel d'action plus longue dans les cellules du mi-myocarde (cellules M) (Liu & Antzelevitch, 1995). Ceci s'explique par l'expression hétérogène du transcrite de KCNQ1 à travers la paroi ventriculaire chez le chien (Dumaine *et al.*, 2000). Ainsi, l'ARN messenger de KCNQ1 est retrouvé en plus faible quantité dans le mi-myocarde que dans l'épicarde et l'endocarde. La présence de ERG au niveau protéique et ARN messenger dans le nœud sinusal chez le lapin (Wymore *et al.*, 1997) et le furet (Brahmajothi *et al.*, 1997) permet de faire le lien avec la présence de  $I_{Kr}$ . HERG est également exprimé dans les oreillettes et ventricules chez l'humain (Pond *et al.*, 2000). Dans le cœur du furet, l'ARN messenger de ERG est 20% plus important dans le ventricule droit que dans le ventricule gauche (Trudeau *et al.*, 1995).

MiRP1 est exprimé dans le nœud sinusal notamment chez le lapin, au niveau ARNm (Yu *et al.*, 2001), ceci étant en accord avec la présence de  $I_{Kr}$  dans cette région.  $I_{Kr}$  et  $I_{Ks}$  sont tous deux présent dans les oreillettes chez le cobaye (Sanguinetti & Jurkiewicz, 1991), le chien (Yue *et al.*, 1996b) et l'humain (Wang *et al.*, 1994). Chez le chien,  $I_{Kr}$  est plus important dans les cellules auriculaires gauches que droites (Li *et al.*, 2001).

Au contraire du nœud sinusal où  $I_{Kr}$  et  $I_{Ks}$  sont tous deux importants,  $I_{Kr}$  est prédominant dans le nœud auriculo-ventriculaire (Sato *et al.*, 2000).

Les niveaux d'expression d'ARNm de ERG et KvLQT1 sont plus faibles dans les fibres de Purkinje (Han *et al.*, 2002a), ceci étant consistant avec un potentiel d'action plus long retrouvé dans ce tissu.

$I_{Kur}$ , qui s'active plus rapidement que  $I_{Kr}$  a été décrit dans les oreillettes chez le rat (Boyle & Nerbonne, 1991), la souris (Bou-Abboud *et al.*, 2000), l'humain (Wang *et al.*, 1993b) et le chien (Yue *et al.*, 1996a). Chez l'humain et le chien,  $I_{Kur}$  est présent dans les oreillettes mais pas dans les ventricules (Li *et al.*, 1996b). Kv2.1 chez le rat est plus abondant dans le ventricule que dans l'oreillette (Dixon & McKinnon, 1994). Il est possible que Kv2.1 porte le courant  $I_{ss}$  endogène ventriculaire chez le rat (équivalent de  $I_{Kur}$ ), mais il existe dans cette région une faible corrélation entre l'expression de Kv2.1 et la densité de courant  $I_{Kur}$  endogène (Schultz *et al.*, 2001).

#### II-4-1-3 Le courant sortant à rectification entrante, $I_{K1}$

Le courant  $I_{K1}$  auriculaire est de 6 à 10 fois plus petit que le courant ventriculaire (Wang *et al.*, 1998), expliquant ainsi le potentiel maximum diastolique moins négatif dans les oreillettes et la phase de repolarisation (phase 3) plus lente. Kir2.1 est, de la famille Kir2, la sous-unité qui est le plus exprimé au niveau ARNm dans les ventricules et oreillettes. Cependant, le niveau d'expression de cette sous-unité est identique dans les deux tissus (Wang *et al.*, 1998). Par contre l'expression d'ARNm de Kir2.3 est plus concentrée dans l'oreillette humaine que dans le ventricule alors que le niveau de Kir2.2 est équivalent dans les deux tissus (Wang *et al.*, 1998). Au niveau protéique, l'expression de Kir2.1 est 80% plus importante dans le ventricule que dans l'oreillette alors que l'expression de Kir2.3 est 228% plus importante dans l'oreillette (Melnyk *et al.*, 2002).

Par ailleurs, l'expression de Kir2.1 est très limitée dans le nœud sinusal chez le furet. Ceci étant en accord avec l'apparente absence du courant dans ce tissu (Brahmajothi *et al.*, 1996).  $I_{K1}$  est retrouvé dans le nœud auriculo-ventriculaire en faible densité, consistant avec son potentiel diastolique maximum positif (Hancox & Mitcheson, 1997). Cette distribution protéique ne permet pas vraiment d'expliquer les



différences d'expression du courant endogène observées dans le ventricule et les oreillettes

#### II-4-1-4 Le courant potassique sensible à l'acétylcholine,

$I_{K_{ACh}}$

Kir3.1 est présente dans le nœud sinusal chez le rat, furet, et cobaye (Dobrzynski *et al.*, 2001). Kir3.4 est elle, présente dans le nœud sinusal chez le rat au niveau protéique (Dobrzynski *et al.*, 2001).

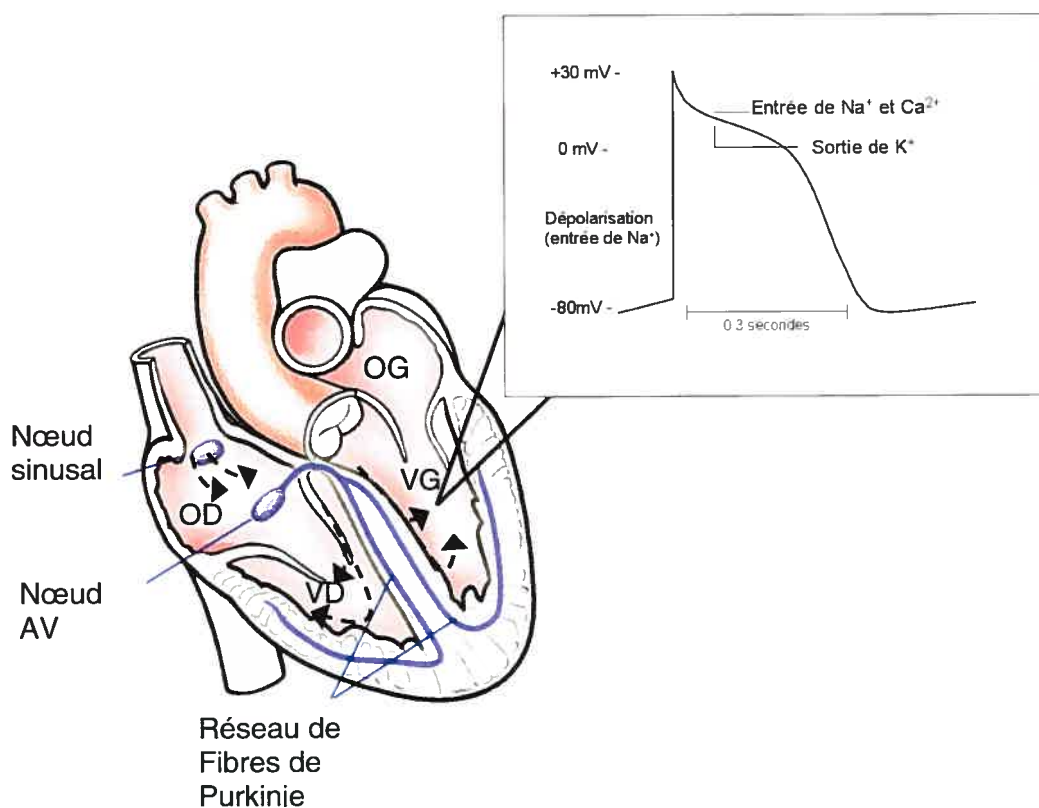
#### II-4-1-5 Le courant potassique sensible à l'ATP, $I_{K_{ATP}}$

Ce canal ne présente pas de variations dans le niveau d'expression selon la région. En effet,  $I_{K_{ATP}}$  est distribué uniformément dans le ventricule droit et gauche ainsi que dans les différentes couches du ventricule (Nerbonne & Kass, 2003).

### III- Pathophysiologie des canaux potassiques cardiaques

Les mécanismes cellulaires essentiels dans le contrôle de l'activité électrique cardiaque sont représentés dans la figure 12. L'activité électrique est initiée au niveau du nœud sinusal à une fréquence qui permet de répondre aux besoins physiologiques. L'impulsion qui en résulte est ensuite conduite à travers le tissu cardiaque grâce notamment à l'entrée d'ions sodiques durant la phase 0 du potentiel d'action (figure 3). Il s'en suit une dépolarisation de la cellule (le potentiel membranaire devient plus positif) et le déclenchement du mécanisme de contraction musculaire par le relâchement d'ions calciques à partir du réticulum endoplasmique. Une fois la cellule excitée, elle rentre dans une phase de non excitabilité, appelée « période réfractaire », jusqu'à ce qu'elle retrouve son état de repos initial résultant de la repolarisation cellulaire. Le processus de repolarisation est le résultat d'un équilibre fragile entre les courants ioniques entrants (les ions  $Na^+$  ou  $Ca^{2+}$  qui entrent dans la cellule afin de la dépolariser) et les courants ioniques potassiques sortants qui repolarisent la cellule jusqu'à son niveau de repos initial (figure 12) dont les courants

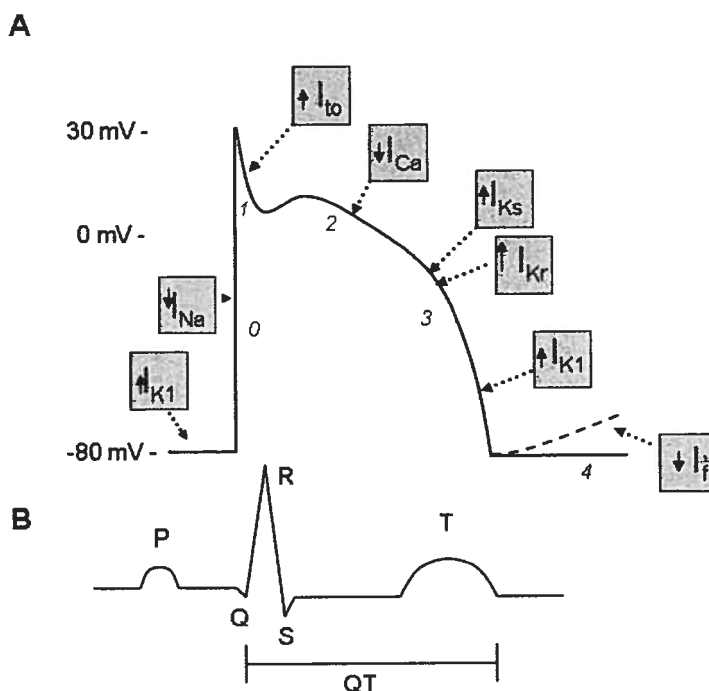
les plus importants sont le courant transitoire sortant ( $I_{to}$ ), la composante rapide ( $I_{Kr}$ ) et lente ( $I_{Ks}$ ) du courant retardé de rectification  $I_K$ . Le moindre déséquilibre entre les courants entrants et sortants perturbe le phénomène de repolarisation cellulaire et le cœur devient alors plus susceptible au développement d'arythmies cardiaques. Ceci explique pourquoi des mutations dans les gènes qui codent pour divers canaux impliqués dans la repolarisation sont sources d'arythmies, allant jusqu'à provoquer le syndrome de mort subite.



**Figure 12** : l'activité électrique responsable du battement cardiaque. L'impulsion cardiaque a pour origine le nœud sinusal. Elle se propage à une vitesse modérée dans les oreillettes, est ralentie dans le nœud AV avant d'atteindre les ventricules par les fibres de Purkinje. Suite à l'excitation des fibres de Purkinje, l'impulsion traverse les différentes couches du ventricule, de l'endocarde vers l'épicarde. En encadré,

potentiel d'action typique dans les cellules musculaires du cœur (modifié à partir de Nattel *et al.*, 2003).

L'intervalle QT mesuré sur l'ECG est utilisé en clinique pour évaluer la durée globale de la repolarisation. L'intervalle QT dans son entier est considéré comme une mesure de la durée du potentiel d'action (entre l'activation et la repolarisation du ventricule) (Zareba & Moss, 2003).



**Figure 13:** Relation entre un potentiel d'action cardiaque avec ses courants sous jacents et un électrocardiogramme. A, lors de la phase 0 du potentiel d'action, les canaux sodiques se trouvent dans une configuration ouverte, laissant les ions sodium rentrer dans la cellule. Ceci constitue la phase de dépolarisation. Une phase rapide de repolarisation s'en suit (phase 1), due à l'ouverture transitoire de courants potassiques ( $I_{to}$ ). La phase 2 est caractéristique de la phase de plateau qui s'explique par la balance entre des courants entrants ( $I_{Ca}$ ) et des ions sortants ( $I_K$ ) avec sa composante rapide ( $I_{Kr}$ ) et sa composante lente ( $I_{Ks}$ ). L'inactivation des courants calciques ( $I_{Ca}$ ) permet au courant potassique sortant ( $I_K$ ) de repolariser la cellule (phase 3). La phase finale de la repolarisation se fait par la sortie d'ions potassium

due au courant à rectification entrante ( $I_{K1}$ ). Certaines cellules telles que celles retrouvées dans le nœud sinusal, dans le nœud auriculo-ventriculaire ou dans les cellules de Purkinje montrent une phase de dépolarisation lente diastolique due au courant pacemaker  $I_f$ . Les sous-unités impliquées dans le canal qui porte chaque courant sont indiquées en orange. **B**, représentation d'un électrocardiogramme mettant en évidence l'intervalle QT, marqueur de la repolarisation ventriculaire (modifié à partir de Pourrier *et al.*, 2004).

### III-1 Syndrome du QT long

#### III-1-1 Syndrome du QT long impliquant des canaux potassiques

Ce syndrome est marqué par l'allongement anormal de l'intervalle QT relevé sur l'électrocardiogramme. Au niveau clinique, ceci se manifeste par des palpitations, faiblesses et même perte de connaissance. Ultimement, on peut observer le déclenchement d'une fibrillation ventriculaire provoquée par le phénomène de torsades de pointes (tachycardie ventriculaire polymorphe), menant à une mort subite. La base moléculaire de ce syndrome est décrite dans le tableau 5. Le phénomène de torsades de pointe a été décrit pour la première fois par Dessertenne en 1966 (Dessertenne, 1966). Cette forme de tachyarythmie ventriculaire polymorphe est caractérisée par un changement répétitif du principal vecteur QRS. Ce type de tachycardie dépend de la présence de repolarisation prolongé en rythme normal ou ralenti qui précède le son déclenchement.

Le syndrome du QT long peut être congénital ou acquis (Camm *et al.*, 2000). La forme génétique est principalement causée par des mutations dans les gènes codant pour des canaux ioniques. Généralement, la forme innée est du type dominant autosomique (syndrome de Romano Ward) où l'altération d'un simple allèle est suffisante pour produire le phénotype arythmogène. Il existe également une forme autosomique récessive (Jervell Lange Nielsen) qui associe une surdité profonde au phénotype cardiaque. Les deux syndromes partagent le phénotype cardiaque qui inclut la prolongation de l'intervalle QT ainsi que des tachyarythmies ventriculaires se manifestant par une syncope ou une mort subite cardiaque.

Syndrome	Gène	Fonction	Conséquence des mutations sur la fonction des canaux et sur le PA	Phénotype clinique
LQT1 RWS, JNLI	KCNQ1	Code pour la sous-unité $\alpha$ (KvLQT1) du canal potassique $I_{Ks}$ , responsable de la phase 3 du PA	$\downarrow I_{Ks}$ Prolongation du potentiel d'action cardiaque.	Intervalle QT prolongé, TdP (surtout suite à un stress émotionnel), exercice.
LQT2 RWS	KCNH2	Code pour la sous-unité $\alpha$ (HERG) du canal potassique $I_{Ks}$ , responsable de la phase 3 du PA	$\downarrow I_{Kr}$ Prolongation du potentiel d'action cardiaque.	Intervalle QT prolongé, TdP (suite à un stress).
LQT3 RWS	SCNA5	Code pour la sous-unité $\alpha$ du canal sodique $I_{Na}$ responsable de la phase 0 du PA	$\uparrow I_{Na}$ Prolongation du potentiel d'action cardiaque.	Intervalle QT prolongé, syncope, mort subite (surtout pendant le sommeil ou au repos)
LQT4 RWS	Ankyrine	Responsable du ciblage des protéines transporteurs d'ions vers la membrane	$\downarrow$ pompe sodique, $\downarrow$ échangeur $Na^+ / Ca^{2+}$ , $\downarrow$ récepteur inositol triphosphate. Altération de la signalisation du calcium.	Intervalle QT prolongé, AVP, mort subite, extrasystole, FA

LQT5 RWS, JNL2	KCNE1	Code pour la sous-unité $\beta$ (MinK) du canal potassique $I_{Ks}$ responsable de la phase 3 du PA	$\downarrow I_{Ks}$ Prolongation du potentiel d'action cardiaque	Intervalle QT prolongé, TdP.
LQT6 RWS	KCNE2	Code pour la sous-unité $\beta$ (MiRP1) de plusieurs canaux potassiques ( $I_{Kr}$ , $I_{K0}$ , $I_f$ )	Altération de $I_{Kr}$ en ralentissant leur activation, en accélérant leur désactivation et $\uparrow$ la sensibilité à certains agents pharmacologiques.	Intervalle QT prolongé, TdP.
LQT7 (Andersen's syndrome)	KCNJ2	Code pour la sous-unité $\alpha$ (Kir2.1) du canal potassique $I_{K1}$ , responsable du maintien du potentiel de repos et de la dernière phase de la repolarisation	$\downarrow I_{K1}$	TV bidirectionnelle, malformations musculo-squelettiques complexes.
Brugada syndrome	SCNA5	Code pour la sous-unité $\alpha$ du canal sodique $I_{Na}$ responsable de la phase 0 du PA	$\downarrow I_{Na}$ Dispersion de la repolarisation	Intervalle QT normal, élévation du segment ST, inversion de l'onde T. Mort subite due à une FV.
TV catécholamine-dépendante.	Récepteur Ryanodine (RYR2)	Responsable de la relâche de calcium à partir du réticulum sarcoplasmique dans le cytosol	$\uparrow$ de la relâche de calcium dans le cytosol	Intervalle QT normal ou raccourci, TV bidirectionnelle ou polymorphique sensible aux catécholamines, FV avec stress.

**Tableau 4** : Syndromes génétiques d'arythmie. RWS, syndrome de Romano Ward. Décrit une forme autosomique dominante du syndrome du QT long (1 à 6); JNL, syndrome de Jervell-Lange-Nielsen. Décrit une forme autosomique récessive avec une surdité congénitale (modifié à partir de Pourrier *et al.*, 2004)

### III-1-1-1 Syndrome LQT1

Il met en jeu des mutations dans le gène exprimant la sous-unité  $\alpha$  KvLQT1 et représente le génotype le plus fréquent (30 à 50% des formes autosomiques dominantes du SLQT) (Ackerman, 1998). Ceci inclut des mutations non-sens, des délétions et insertions. Ces mutations altèrent les propriétés d'ouverture et de fermeture du canal ou mènent à la formation de canaux non fonctionnels en agissant comme dominant négatif (Chouabe *et al.*, 1997) expliquant par le fait même le prolongement de la durée du potentiel d'action et l'allongement de l'intervalle QT. L'expression de KvLQT1 au niveau de l'oreille interne explique son implication dans le syndrome de Jervell and Lange Nielsen (JLN) (Neyroud *et al.*, 1997; Splawski *et al.*, 1997a)

### III-1-1-2 Syndrome LQT2

Des mutations non-sens et des délétions dans le gène codant pour la sous-unité  $\alpha$  HERG sont associées au syndrome LQT2. Des mutations au niveau de HERG provoquent une perte de fonction, agissent comme dominant négatif ou réduisent le transport de la protéine à la membrane. Ceci a pour conséquence de diminuer la densité du courant et d'allonger ainsi la durée du potentiel d'action. À titre d'exemple, la mutation G601S provoque une inhibition du transport de la protéine fonctionnelle jusqu'à la membrane, expliquant la diminution de la densité du courant (Furutani *et al.*, 1999).

### III-1-1-3 Syndrome LQT5

Des mutations rapportées dans le gène KCNE1 codant pour la sous-unité  $\beta$  minK affectent le courant porté par le canal KvLQT1-minK. MinK a un effet dominant négatif sur KvLQT1, menant à une diminution du courant. L'augmentation de la vitesse de désactivation ou le déplacement de la courbe de dépendance au voltage vers des potentiels plus positifs diminue la disponibilité du canal à des potentiels physiologiques, provoquant donc un prolongement de la repolarisation ventriculaire (Mohler *et al.*, 2003).

### III-1-1-4 Syndrome LQT6

Cette forme de syndrome du QT long implique des mutations non-sens dans la protéine auxiliaire MiRP1 (Abbott *et al.*, 1999; Isbrandt *et al.*, 2002). MiRP1 mutée forme un canal qui s'ouvre lentement et se ferme rapidement, diminuant ainsi le courant potassique sortant. Par exemple, la mutation Q9E dans le domaine extracellulaire de MiRP1 aboutit au développement de torsades de pointe et de fibrillation ventriculaire suite à l'injection intraveineuse de clarithromycine (Abbott *et al.*, 1999).

## III-1-2 Syndrome LQT n'impliquant pas de canaux potassiques

### III-1-2-1 Syndrome LQT3

Ce syndrome se caractérise par des mutations au niveau du canal sodique (SCN5A), responsable de la phase de dépolarisation (phase 0) du potentiel d'action cardiaque. Les mutations du gène affectent l'inactivation rapide du canal, laissant un courant entrant soutenu durant une dépolarisation prolongée, allongeant ainsi le potentiel d'action cardiaque (Wang *et al.*, 1997a).



### III-1-2-2 Syndrome LQT4.

Ce syndrome affecte une protéine adaptatrice, l'ankyrine-B qui a pour fonction de cibler d'autres protéines cellulaires vers des domaines spécialisés au niveau de la membrane plasmique ou du réticulum endoplasmique (Mohler *et al.*, 2003). La mutation du gène de l'ankyrine-B provoque une désorganisation cellulaire des protéines  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase et de l'échangeur  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ .

### III-2 Syndrome de Brugada

Le syndrome de Brugada est une arythmie idiopathique ventriculaire. Au contraire des patients touchés par le syndrome du QT long, ceux développant le syndrome de Brugada montrent des caractéristiques électrocardiographiques différentes, notamment le blocage des branches droites de Bundle ainsi qu'une élévation du segment ST (Balsler, 2001). Au niveau de l'épicaarde, une perte de fonction des canaux sodiques provoque un raccourcissement de la durée du potentiel d'action dû à la dominance du courant  $I_{to}$  dans cette région (Antzelevitch, 2001b). Dans l'endocarde,  $I_{to}$  est moins prééminent et l'altération du courant sodique n'a pas les mêmes répercussions sur la durée du potentiel d'action. Cependant, cette hétérogénéité de la repolarisation dans la paroi ventriculaire provoque une élévation du segment ST et les manifestations proarythmiques de réentrée du syndrome de Brugada.

### III-3 Pathologie des canaux acquise

La défaillance cardiaque représente une forme typique de syndrome de QT long acquis (Marban, 1999). Les cardiomyocytes isolés de cœur défaillant ont une durée de potentiel d'action allongée (Beuckelmann *et al.*, 1993). Chez l'humain, la prolongation du potentiel d'action est due à la diminution de deux canaux potassiques:  $I_{to}$  et  $I_{K1}$  (Beuckelmann *et al.*, 1993). La diminution de  $I_{to}$  se fait au niveau transcriptionnel avec une baisse de la production d'ARN messenger codant pour la sous-unité  $\alpha$  Kv4.3 (Kaab *et al.*, 1998). La sous-régulation de ces canaux peut être

le résultat de l'adaptation du cœur aux conditions de cœur défaillant. Cependant, à long terme, la diminution de ces courants prédispose les patients à des post-dépolarisations, à l'hétérogénéité de la repolarisation et à des tachycardies ventriculaires (Marban, 2002).

Le syndrome du QT long peut également être induit par l'utilisation d'agents pharmacologiques qui bloquent les canaux potassiques. Des bloqueurs spécifiques de  $I_{K_r}$  tels que la dofétilide ont été développés pour le traitement d'arythmies auriculaires. Mais malheureusement, celui-ci provoque également une prolongation de l'intervalle QT, ce qui est suffisant pour causer des arythmies ventriculaires dangereuses (torsades de pointe) dans 5 à 7% des cas. Beaucoup d'autres agents cardiaques ou non cardiaques sont capables d'inhiber  $I_{K_r}$  (Caballero *et al.*, 2000; Caballero *et al.*, 2001; Danielsson *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 1998; Moreno *et al.*, 2003; Traebert *et al.*, 2004; Walker *et al.*, 1999).

L'intervalle QT peut être prolongé dans les cas d'un cœur ischémique, menant à une mort subite (Schwartz & Wolf, 1978). Plusieurs canaux ioniques sont sous-régulés et dysfonctionnels dans cette condition pathologique (Kaprielian *et al.*, 1999), expliquant le risque de développer des torsades de pointe lorsque des agents pharmacologiques prolongeant l'intervalle QT sont utilisés. Également, l'utilisation fréquente d'agents diurétiques dans cette condition peut mener à une hypokaliémie et une hypomagnésémie. La baisse de courant  $I_{K_r}$  qui en résulte peut alors provoquer un allongement de la durée du potentiel d'action et des torsades de pointe.

### III-4 La fibrillation auriculaire

La fibrillation auriculaire est une pathologie où le contrôle du rythme cardiaque n'est plus initié normalement dans le nœud sinusal, mais par une activité rapide dans différentes parties au niveau des oreillettes. Ceci résulte en une activité auriculaire rapide et irrégulière. Au lieu de se contracter, l'oreillette ne fait que fibriller. La FA est caractérisée par un raccourcissement marqué de la durée du potentiel d'action et de la période réfractaire effective de l'oreillette et d'une diminution de la vitesse de repolarisation auriculaire. Ceci résultant en l'augmentation de la dispersion de l'état réfractaire ainsi qu'à des changements dans

la vitesse de conduction auriculaire (Nattel, 1999; Zipes, 1997). Elle n'implique pas uniquement les canaux potassiques mais tout canal qui influence la durée du potentiel d'action et la période réfractaire. En effet, cette dernière est un marqueur de la continuité de la fibrillation auriculaire. Si les périodes réfractaires de deux régions voisines sont trop courtes, chaque région sera excitée répétitivement, l'une après l'autre, générant des circuits de réentrée. L'excitation est portée par une onde d'excitation qui correspond au produit de la vitesse de conduction et de la période réfractaire. Par conséquent, si l'onde d'excitation arrive suffisamment rapidement dans la région à exciter (i.e la période réfractaire est terminée) alors, la réentrée sera soutenue. Afin de terminer la fibrillation il faut donc soit augmenter la vitesse de conduction, soit augmenter la période réfractaire. Toute action qui bloque les canaux potassiques repolarisant peut augmenter la période réfractaire et terminer la FA.

### **III-5 Sous régulation des canaux potassiques dans les pathologies cardiaques**

Suite à une hypertrophie cardiaque, les myocytes cardiaques de rat et de félins montrent un prolongement du potentiel d'action cardiaque ainsi qu'une diminution du courant transitoire sortant  $I_{to}$  sans altération de ses propriétés cinétiques ni de ses propriétés de dépendance au voltage (Zhang *et al.*, 2001b; Ten Eick *et al.*, 1993). La phényléphrine, qui est un inducteur de l'hypertrophie inhibe l'activité du promoteur de Kv4.3 (Zhang *et al.*, 2001b), expliquant par le fait même la diminution de courant. L'ARN messenger de la principale sous-unité portant le courant  $I_{to}$ , soit Kv4.3, est diminué dans les rats hypertensifs ainsi que dans les cœurs défaillant humains (Kaab *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1999; Takimoto *et al.*, 1997). Le courant natif  $I_{to}$  est aussi altéré suite à une ischémie chez le rat (Pike *et al.*, 1993), suite à un infarctus du myocarde chez le chien (Lue & Boyden, 1992) ou encore par une glande thyroïde affectée chez le lapin (Shimoni *et al.*, 1992). La densité du courant  $I_{to}$  est plus petite dans la région sous-épicaudique du cœur défaillant humain que dans un cœur sain alors que  $I_{to}$  sous-endocardique n'est pas modifié (Nabauer *et al.*, 1996). Dans la maladie de Chagas (maladie parasitaire), le courant  $I_{to}$  est diminué dû à la dénaturation des terminaisons nerveuses sympathiques (Han *et al.*, 1997). La

réduction de  $I_{to}$  est également liée à la dystrophie musculaire (Pacioretty *et al.*, 1994).

L'utilisation d'agents pharmacologiques afin de bloquer Kv4.2/Kv4.3 a permis de tisser un lien entre ces deux sous-unités et l'hypertrophie cardiaque (Kassiri *et al.*, 2002). En effet, une sous-unité Kv4.2 dominant négatif est capable d'augmenter la durée du potentiel d'action et provoquer par le fait même une réponse hypertrophique (Kassiri *et al.*, 2002).

Dans des conditions de fibrillation auriculaire, le courant  $I_{to}$  est diminué (Bosch *et al.*, 1999; Van Wagoner *et al.*, 1997; Yue *et al.*, 1997), et il se peut que le courant  $I_{K1}$  soit altéré (Bosch *et al.*, 1999; Van Wagoner *et al.*, 1997) alors que les sous-unités HERG, KvLQT1 et minK sont inchangées (Yue *et al.*, 1997). La réduction de l'expression protéique de la sous-unité Kv4.3 vient confirmer la diminution du courant  $I_{to}$  (Yue *et al.*, 1999).

Dans l'hypertrophie et dans la défaillance cardiaque, d'autres canaux potassiques sont sous régulés mais pas avec la même constance que  $I_{to}$ . Ainsi, dans l'hypertrophie ventriculaire,  $I_{K1}$  a été décrit comme étant augmenté (Kleiman & Houser, 1989), diminué (Brooksby *et al.*, 1993) ou inchangé (Cerbai *et al.*, 1994). Dans la défaillance cardiaque humaine,  $I_{K1}$  est sous régulé. La base moléculaire d'une telle sous régulation est incertaine. Kaab et al ont rapporté un niveau de messenger de Kir2.1 inchangé dans les cœurs défaillants comparés aux cœurs contrôles (Kaab *et al.*, 1998). Les études sur la sous-régulation de  $I_K$  dans le cœur défaillant et hypertrophié sont plus rares. Par exemple, les myocytes isolés à partir des ventricules droit (Kleiman & Houser, 1989) et gauche (Furukawa *et al.*, 1994) hypertrophiés chez le chat ont une densité de courant  $I_K$  réduite avec une activation ralentie, et une désactivation accélérée. Au contraire, chez le rat spontanément hypertendu,  $I_K$  ventriculaire ne montre pas de changement (Brooksby *et al.*, 1993). Dans un modèle expérimental d'infarctus du myocarde, la réduction de courants potassiques soutenus a été décrite. Ainsi, les cellules ventriculaires isolées de la zone ischémique présentent une réduction significative de la densité de  $I_{Kr}$  et  $I_{Ks}$  comparé aux mêmes courants dans la zone contrôle (Jiang *et al.*, 2000). La réduction de la densité des courants est associée avec une diminution de l'ARN messenger de

KvLQT1, ERG et minK deux jours après l'occlusion de la coronaire (Jiang *et al.*, 2000).

#### **IV- Pharmacologie des canaux potassiques cardiaques**

Un agent antiarythmique est une substance capable de supprimer les troubles du rythme en perturbant les courants ioniques transmembranaires impliqués dans le potentiel d'action.

Les agents antiarhythmiques sont traditionnellement divisés en quatre classes distinctes sur la base de leur mécanisme d'action principal. La classe I est composée de bloqueurs de canaux sodiques et se divise en sous classe dépendamment de leur cinétique de dissociation. Les agents pharmacologiques qui bloquent l'activité adrénergique (bloqueurs des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques) dans le cœur constituent la classe II. Les agents de classe III prolongent la durée du potentiel d'action. La classe IV se compose de bloqueurs de canaux calciques (Hondegheem & Roden, 2001).

##### **IV-1 Classification des agents antiarythmiques (selon Vaughan Williams)**

Classe I : Les agents de classe I sont classés en 3 sous groupes, sur la base de leur vitesse de dissociation du canal sodique. Les agents appartenant à la classe Ib ont une constante de dissociation inférieure à 1 seconde. Ils ont ainsi peu d'action sur la conduction des tissus normaux, mais peuvent ralentir la conduction dans des situations où deux extrasystoles couplées seraient proches (Grant *et al.*, 2000) ou dans du tissu dépolarisé. Les agents de classe Ic ont la constante de dissociation la plus lente (au-delà de 12 secondes). Il en résulte un ralentissement de la conduction indépendamment du rythme cardiaque. Les agents de classe Ia ont des cinétiques de dissociation intermédiaires (entre 1 et 12 secondes). Ils provoquent un ralentissement de la conduction à des rythmes cardiaques normaux (Grant *et al.*, 2000).

*Classe Ia* : En plus de l'action sur les canaux sodiques, cette classe d'agents prolonge la durée du potentiel d'action en agissant sur les canaux potassiques. La

période réfractaire est alors prolongée. La quinidine, dont le mécanisme d'action sur Kv4.2 a été étudié dans cette thèse est un exemple typique de composé appartenant à cette classe. Cet agent ralentit la conduction et l'excitabilité du tissu cardiaque lorsque celui-ci est dépolarisé (Hondeghem & Roden, 2001). Cet effet est dû à l'action de la quinidine sur le canal sodique ouvert. Par ailleurs elle agit, dans une moindre mesure sur le canal inactivé. La quinidine prolonge la durée du potentiel d'action qui se reflète par un intervalle QT allongé sur l'électrocardiogramme. Le blocage des canaux potassiques (diminution de courant sortant repolarisant) est responsable de cet effet (Snyders *et al.*, 1992). La prolongation de la durée du potentiel d'action accompagnée du prolongement de la période réfractaire a pour conséquence d'augmenter l'efficacité de la quinidine puisque le tissu cardiaque passe moins de temps à des potentiels de membrane diastolique. Ce prolongement de la période réfractaire a pour effet de diminuer la fréquence des circuits de réentrée. Les agents de classe Ia ont une use-dépendance intermédiaire. La use-dépendance est fonction de la cinétique de fixation et de libération de l'antiarythmique des récepteurs du canal sodique. Ainsi, en cas de haute fréquence cardiaque ou de dépolarisation cellulaire, les antiarythmiques saturent plus de récepteurs et diminuent la  $V_{max}$ . Cette diminution étant proportionnelle à la « use-dépendance » du composé.

*Classe Ib* : Ces agents se lient et se détachent rapidement du canal sodique et raccourcissent la durée du potentiel d'action. Comme exemple, la lidocaïne agit exclusivement et rapidement sur le canal sodique lorsque celui-ci se trouve sous la forme activée et inactivée (Hondeghem & Roden, 2001). Elle montre donc une faible « use-dependence ». Le raccourcissement du potentiel d'action augmente le temps passé pour la cellule à des potentiels diastoliques permettant ainsi un retour de l'ensemble des canaux sodiques dans leur état activable. La lidocaïne a ainsi pour effet de supprimer les arythmies dues à des troubles de l'automaticité.

*Classe Ic* : Ces agents se lient et se détachent lentement du canal et n'ont pour la plupart pas d'effet ou prolongent légèrement le potentiel d'action. Par conséquent, le canal a peu de temps pour être réactivé après la dissociation du médicament dans l'intervalle diastolique, même à un rythme cardiaque lent

physiologique. Suite à l'étude CAST, l'utilisation de la flécaïnide a été réduite cliniquement. En effet, cette étude a mis en lumière son effet toxique, provoquant une augmentation du taux de mortalité chez les patients (CAST investigators, 1989).

Classe II : Ce sont des agents  $\beta$  bloquants qui diminuent la dépolarisation de la phase 4, diminuant ainsi l'automatisme, prolongeant la conduction dans le nœud auriculo ventriculaire, diminuant le rythme cardiaque et la contractilité cardiaque (Mycek *et al.*, 1997). Les agents de classe II bloquent de manière compétitive les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques et diminuent le courant  $I_f$ . Les  $\beta$ -bloquants diminuent la pente de dépolarisation diastolique lente spontanée des cellules nodales, induisant alors une bradycardie sinusale. Comme exemple, on peut citer le propranolol qui est l'antagoniste bêta adrénergique le plus utilisé dans le traitement des arythmies cardiaques (Mycek *et al.*, 1997). En ralentissant l'activité ventriculaire par la diminution de la conduction auriculo-ventriculaire, le propranolol est efficace dans le traitement et la prévention des tachycardies supraventriculaires.

Classe III : Ces agents bloquent les courants potassiques et prolongent donc le potentiel d'action et la période réfractaire. La classe III est principalement représentée par l'amiodarone et le sotalol. Ces agents sont particulièrement actifs dans la réduction et la prévention du flutter et de la fibrillation auriculaire (Van Gelder *et al.*, 2002; Wyse *et al.*, 2002).

Classe IV : Ces agents bloquent les canaux calciques. Ceci peut provoquer un ralentissement de la vitesse de conduction et augmenter la période réfractaire dans les tissus dépendants du calcium tel que le nœud auriculo-ventriculaire. Exemple : le vérapamil, qui bloque le canal calcique dans sa forme active et inactive (Hondeghe & Roden, 2001).

#### **IV-2 Actions des agents antiarythmiques sur les canaux potassiques**

Lors de notre étude sur la fonction moléculaire de Kv4.2, nous avons utilisé les agents pharmacologiques flécaïnide et quinidine. Tel que décrit dans la section

précédente, la quinidine appartient à la classe Ia des agents antiarythmiques alors que la flécaïnide appartient à la classe Ic. Ils agissent donc préférablement sur le canal sodique. Cependant, ces deux agents provoquent aussi un allongement de la durée du potentiel d'action. La quinidine bloque  $I_{to,f}$  dans les cellules natives (Imaizumi & Giles, 1987) et  $Kv4.2$  dans les cellules de mammifères (Yeola & Snyders, 1997). Il a été démontré que la flécaïnide prolongeait également le potentiel d'action (Vanhoutte *et al.*, 1991) en bloquant  $I_K$  et  $I_{to}$  (Slawsky & Castle, 1994). La flécaïnide bloque le courant  $I_{to}$  dans son état inactivé alors que la quinidine le bloque lorsque le canal est à l'état ouvert (Wang *et al.*, 1995).

#### IV-2-1 Actions des agents antiarythmiques sur $I_{to}$

Le courant transitoire sortant  $I_{to}$  n'est généralement pas une cible privilégiée dans la recherche de nouveaux agents pharmacologiques car son rôle dans la durée du potentiel d'action est quelque peu controversé.

Cependant, il se peut que l'hétérogénéité régionale de l'expression de  $I_{to}$  ainsi que la prolongation du potentiel d'action telle que vue dans l'hypertrophie cardiaque et la défaillance cardiaque soient responsables de l'augmentation de la prédisposition aux arythmies ventriculaires et à la mort subite (Antzelevitch & Fish, 2001).

Des agents antiarythmiques classiques tels que la quinidine, ou le sotalol entre autre sont capables de bloquer le courant transitoire sortant. Ainsi, la quinidine augmente la durée du potentiel d'action dans les fibres de Purkinje et favorise l'apparition de post dépolarisations précoces (EADs). Cet effet étant dû au blocage du courant dépendant du temps,  $I_{Ks}$  (Colatsky, 1982). Dans les cellules ventriculaires, l'action de la quinidine serait due au blocage de  $I_{to}$  (Imaizumi & Giles, 1987).

#### IV-2-2 Actions des agents antiarythmiques sur $I_{Kr}$

Un certain nombre de bloqueurs du courant  $I_{Kr}$  tels que le sémtilide, le D-sotalol, l'E-4031, la dofétilide, le MK-499, l'ibutilide et les almokilants ont une efficacité antiarythmique dans des modèles animaux d'arythmies cardiaques



(Adaniya & Hiraoka, 1990; Black *et al.*, 1991; Buchanan *et al.*, 1992; Farkas *et al.*, 1998; Jurkiewicz & Sanguinetti, 1993; Katoh *et al.*, 1990; Lynch *et al.*, 1985; Lynch, Jr. *et al.*, 1990; Lynch, Jr. *et al.*, 1994; Rasmussen *et al.*, 1992; Sager *et al.*, 1993; Sanguinetti & Jurkiewicz, 1990; Yang *et al.*, 1995c).

L'utilisation de tels composés comme agents antiarythmiques a été revue suite à la découverte de l'implication de HERG dans le syndrome congénital du QT long (Curran *et al.*, 1995). En effet, des mutations dans le gène codant pour HERG altère la fonction du courant natif  $I_{Kr}$ , provoquant un allongement de l'intervalle QT qui initie des tachycardies polymorphes (torsades de pointe). Par conséquent, l'usage d'agents bloqueurs de  $I_{Kr}$  pourrait initier le même type de réponse que chez les sujets présentant la forme congénitale du syndrome. Par ailleurs, une étude clinique portant sur l'effet de la prise orale de D-sotalol sur la mortalité de patients ayant eu un infarctus du myocarde (SWORD) a révélé une augmentation de la mortalité de ces patients, mortalité due à des arythmies cardiaques (Waldo *et al.*, 1996). Un certain nombre d'agents bloquant  $I_{Kr}$  (cardiaque et non cardiaque) sont capables de prolonger l'intervalle QT de l'électrocardiogramme et d'augmenter les risques de mort subite (Haverkamp *et al.*, 2000). C'est pour cette raison que le développement de ces agents a été, en général, abandonné (Wickenden, 2002). Seule la dofétilide (Tikosyn) et l'ibutilide (Corvert) sont actuellement approuvés par la Food and Drug Administration (FDA). La dofétilide est utilisée pour la conversion et le maintien du rythme sinusal chez les patients ayant une fibrillation auriculaire symptomatique. L'ibutilide intraveineux est utilisé pour la conversion rapide de la fibrillation auriculaire ou du flutter auriculaire en rythme sinusal normal (Wickenden, 2002).

	$I_{Kr}$	$I_{Ks}$	$I_{K1}$	$I_{to}$
Classe IA				
Quinidine	+	-	+	+
Disopyramide	+	-	+	+
Procaïnamide	+	-	-	-
Classe IC				
Flécaïnide	+	-	-	-
Encaïnide	+	-	-	-
Classe III				
Sotalol	+	-	+	+
Amiodarone	+	+	+	-
Bretylium	+	-	-	+
Dofétilide	+	-	-	-
Tédisamil	+	-	-	+
Azimilide	+	+	-	-

**Tableau 5:** Spécificité d'action des agents antiarythmiques sur les canaux potassiques (modifié à partir de Jahangir *et al.*, 2003).

#### IV-2-3 Actions des agents antiarythmiques sur $I_{Ks}$

Une des restrictions des agents bloqueurs de  $I_{Kr}$  est leur « reverse use-dependence ». C'est-à-dire que ces composés ont un effet plus important lorsque la fréquence cardiaque est lente (soit lorsque le risque de développer des torsades de pointe est plus élevé). Ainsi, la prolongation du potentiel d'action par des bloqueurs de  $I_{Kr}$  à basse fréquence cardiaque peut avoir une incidence sur l'apparition de torsades de pointes. Il se peut que cette « reverse use-dependence » résulte du fait

que  $I_{Kr}$  participe moins à la repolarisation que ne le fait la composante lente de  $I_K$ ,  $I_{Ks}$ , à haute fréquence (Jurkiewicz & Sanguinetti, 1993). Ceci s'explique par l'accumulation de courant suite à l'activation fréquente du canal et par le fait qu'il n'ai pas le temps de se désactiver (O→C) à haute fréquence. C'est pour cette raison qu'il reste plus longtemps à l'état ouvert.  $I_{Ks}$  est donc devenu un candidat potentiel comme cible thérapeutique. Ainsi, puisqu'un agent qui prolonge le potentiel d'action préférentiellement à haute fréquence ne devrait pas avoir de propriétés proarythmiques,  $I_{Ks}$  devrait être une meilleure cible thérapeutique (Hondeghe & Snyders, 1990).

Il existe plusieurs agents bloqueurs sélectifs de  $I_{Ks}$  tels que HMR-1556, 1-768673 et le chromanol 293B qui possèdent une efficacité antiarythmique dans des modèles animaux (Bleich *et al.*, 1997; Busch *et al.*, 1996; Gogelein *et al.*, 2000; Lynch, Jr. *et al.*, 1999; Selnick *et al.*, 1997). Cependant, comme pour les bloqueurs de  $I_{Kr}$ , le syndrome du QT long est associé à des mutations dans les gènes codant pour  $KvLQT1$  et  $KCNE1$  (Barhanin *et al.*, 1996; Sanguinetti *et al.*, 1996; Schulze-Bahr *et al.*, 1997; Splawski *et al.*, 1997b; Wang *et al.*, 1996a). Par conséquent, l'inhibition de  $I_{Ks}$  pourrait également entraîner l'apparition de torsades de pointe.

Le HMR 1556 semble être l'agent pharmacologique le plus spécifique et son utilisation a permis de clarifier l'importance de la participation de  $I_{Ks}$  dans la repolarisation cardiaque (Nakashima *et al.*, 2003) (tel que décrit p 28-29).

#### IV-2-4 Actions des agents antiarythmiques sur $I_{Kur}$

Les myocytes auriculaires humains ont un nombre important de canaux en commun avec les cellules ventriculaires. Ainsi, le dofétilide (classe III) prolonge le potentiel d'action de la même façon dans l'oreillette et dans le ventricule (Wang *et al.*, 1994). Les agents de classe III sont donc efficaces dans le traitement de la fibrillation auriculaire, mais leur utilisation est réduite du fait du risque proarythmique de ces agents. En plus de  $I_{to}$ ,  $I_{Kr}$  et  $I_{Ks}$ , les myocytes auriculaires humains possèdent le courant  $I_{Kur}$ . Ce courant est une cible privilégiée puisqu'il est absent des cellules ventriculaires humaines (Feng *et al.*, 1997). Comme décrit dans la section base moléculaire du courant  $I_{Kur}$ , il est suggéré que  $Kv1.5$  soit la base moléculaire du

courant natif (Wang *et al.*, 1993b). Kv1.5 pourrait ainsi être une cible thérapeutique importante au niveau des oreillettes, sans répercussion sur les ventricules. Ainsi, il a été récemment démontré qu'un dérivé du benzopyran, le NIP-142 pouvait prolonger la période réfractaire dans les oreillettes mais pas dans les ventricules (Matsuda *et al.*, 2001).

#### **IV-2-5 Actions des agents antiarythmiques sur $I_{KATP}$**

Comme on l'a déjà décrit précédemment, ce courant est inhibé par des concentrations physiologiques d'ATP. Son incidence sur l'électrophysiologie cardiaque dans des conditions normales est donc nulle. Cependant, ce courant s'active suite à une ischémie, et contribue par conséquent au raccourcissement du potentiel d'action, à l'accumulation de potassium extracellulaire, à la dépolarisation cellulaire et au ralentissement de la vitesse de conduction dans le myocarde ischémique (Wickenden, 2002). Dans des conditions normales, les bloqueurs de  $I_{KATP}$  sont donc sans action sur la durée du potentiel d'action mais deviennent important en cas d'ischémie.

**DEUXIÈME PARTIE:  
CONTRIBUTION ORIGINALE**

# **Hypothèses de travail et buts du projet de recherche**


Les fonctions moléculaires des sous-unités formant les canaux potassiques sont d'une importance capitale afin d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes régissant les courants endogènes cardiaques.

Dans ce projet, nous nous sommes intéressés aux propriétés biophysiques et pharmacologiques des canaux potassiques cardiaques, et plus particulièrement à l'importance des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  les constituant.

Ainsi, Kv4.2 est la sous-unité  $\alpha$  portant le courant transitoire sortant chez plusieurs mammifères. Une des principales caractéristiques de Kv4.2 est son inactivation rapide. Elle permet seulement une ouverture transitoire du canal afin de limiter l'effet repolarisant immédiat de la phase 1 du potentiel d'action et d'éviter un retour trop rapide au niveau du potentiel de repos. Nous avons décrit les différents mécanismes d'inactivation dans la section II-2. Plusieurs évidences dans la littérature suggèrent que les sous-unités  $\alpha$  de la famille Kv4 s'inactivent par un mécanisme distinct des mécanismes conventionnels (Bahring *et al.*, 2001a; Beck & Covarrubias, 2001; Jerng & Covarrubias, 1997; Jerng *et al.*, 1999).

Dans une première partie, nous avons mis en évidence l'importance de résidus acides aminés situés dans le sixième segment transmembranaire dans le mécanisme d'inactivation de Kv4.2. Nous avons ensuite émis l'hypothèse selon laquelle l'effet des agents pharmacologiques quinidine et flécaïnide sur Kv4.2 de type sauvage et muté était modifié par le changement structural de Kv4.2, ceci dans le but d'avoir une meilleure connaissance des déterminants moléculaires responsables de l'effet bloquant. Ces deux composés agissent différemment sur le canal puisque la quinidine agit sur le canal lorsqu'il se trouve à l'état ouvert (Imaizumi & Giles, 1987), alors que la flécaïnide agit sur le canal à l'état inactivé (Wang *et al.*, 1995).

Il est maintenant bien établi que la sous-unité  $\beta$  KCHIP2 interagit avec Kv4.2/4.3 afin de récapituler plus fidèlement le courant endogène  $I_{to}$  (An *et al.*, 2000). Par la mise au point d'une protéine canal chimérique constituée de l'extrémité N-terminale de Kv4.2 remplaçant celle de Kv1.4 dans Kv1.4, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle l'extrémité N-terminale de Kv4.2 était suffisante pour transférer ses propriétés cinétiques et d'interaction avec KCHIP2 à Kv1.4. Ceci étant dans le but de clarifier la modulation de  $I_{to}$  par KCHIP2.

Outre KChIP2, il a été démontré que la sous-unité  $\beta$  MiRP1 était capable d'interagir avec Kv4.2 et récapitulait certaines propriétés du courant endogène cardiaque  $I_{to}$ . On a vu précédemment que MiRP1 interagissait avec un certain nombre de sous-unité  $\alpha$  afin de moduler leur expression et que des mutations du gène KCNE2 étaient associées au syndrome du QT long. Cependant, il apparaît que MiRP1 n'est exprimé qu'à un très faible niveau dans le ventricule, suggérant un rôle limité dans cette région. Aussi, les fibres de Purkinje jouent un rôle très important dans l'électrophysiologie cardiaque et contribuent aux arythmies ventriculaires, reflet d'une repolarisation anormale. Elles sont notamment le site d'induction de post-dépolarisations précoces (EADs), facilitées par leur potentiel d'action plus long que dans le ventricule (Nattel *et al.*, 1988). Nous avons donc émis l'hypothèse selon laquelle le niveau d'expression de MiRP1 était plus important dans les fibres de Purkinje que dans les ventricules.

Cette section nous a permis de confirmer la faible expression de MiRP1 dans le ventricule et mis en évidence son haut niveau d'expression dans les fibres de Purkinje suggérant l'importance de cette région dans l'initiation du syndrome du QT long.

Le courant transitoire sortant dans les fibres de Purkinje répond à une base moléculaire distincte de celle du ventricule, tel que suggéré par Han et al, 2002. Notamment, la sous-unité  $\alpha$  Kv3.4 qui porte un courant de type transitoire sortant est largement exprimée dans les fibres de Purkinje, au contraire de Kv4.2. Kv3.4 partage également certaines propriétés du courant endogène cardiaque  $I_{to}$ . Par ailleurs, Kv3.4 s'associe à MiRP2 dans le muscle squelettique (Abbott *et al.*, 2001) et MiRP1 s'associe à Kv3.1 et Kv3.2 pour expliquer certaines propriétés de courants exprimés au niveau du système nerveux central (Lewis *et al.*, 2003).

Nous avons donc émis l'hypothèse selon laquelle MiRP1 pouvait interagir et moduler les propriétés ioniques de Kv3.4 et expliquer ainsi certains aspects de l'électrophysiologie des fibres de Purkinje.

Finalement, il est établi que MiRP1 interagit avec HERG. Cependant, l'idée que MiRP1 s'associe physiquement avec HERG afin de reconstituer le courant endogène  $I_{Kr}$  est quelque peu controversée du fait de son faible niveau d'expression



au niveau ventriculaire. De plus, la co-expression de MiRP1 avec HERG ne permet pas de restituer les propriétés ioniques de  $I_{Kr}$ . Par ailleurs, l'émergence du concept de domaine cellulaire renfermant un regroupement de protéines spécialisées nous a mener à formuler l'hypothèse selon laquelle les sous-unités  $\alpha$  constituant les courants endogènes  $I_{Kr}$  et  $I_{Ks}$ , soit HERG et KvLQT1 respectivement, pourraient interagir et que la modulation de HERG par KvLQT1 pourrait reproduire certaines propriétés du courant  $I_{Kr}$  endogène.

Dans cette thèse, nous avons rapporté plusieurs éléments nouveaux permettant :

- Une meilleure connaissance du mécanisme d'inactivation de Kv4.2 et le mode de liaison de deux agents pharmacologiques sur la sous-unité  $\alpha$  Kv4.2 de type sauvage et modifiée.
- Une meilleure compréhension dans le fonctionnement de la sous-unité  $\beta$  KChIP2 avec les sous-unités  $\alpha$  Kv4.2 et Kv1.4.
- De mesurer le niveau d'expression de la sous-unité  $\beta$  MiRP1 dans différentes régions du tissu cardiaque.
- De mettre en évidence une nouvelle interaction entre une sous-unité  $\alpha$  (Kv3.4) et une sous-unité  $\beta$  (MiRP1).
- De mettre en évidence une nouvelle interaction entre deux sous-unités  $\alpha$ , HERG et KvLQT1.

**CHAPITRE II: EFFECTS OF FLECAINIDE AND  
QUINIDINE ON KV4.2 CURRENTS: VOLTAGE  
DEPENDENCE AND ROLE OF S6 VALINES**

Ce manuscrit a été publié dans la revue *British Journal of Pharmacology*, 2003; 138:  
1475-1484.

# Effects of flecainide and quinidine on Kv4.2 currents: Voltage dependence and role of S6 valines

<sup>1</sup>Ricardo Caballero, <sup>2\*</sup>Marc Pourrier, <sup>2\*</sup>Gernot Schram, <sup>1</sup>Eva Delpón,  
<sup>1</sup>Juan Tamargo & <sup>H2,3</sup>Stanley Nattel

<sup>1</sup>Department of Pharmacology, School of Medicine, Universidad Complutense, Madrid, Spain; <sup>2</sup>Department of Medicine and Research Center, Montreal Heart Institute and University of Montreal, Montreal, Quebec, H1T 1C8, Canada and <sup>3</sup>Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Montreal, Quebec, H3G 1Y6, Canada

**Short running title:** Flecainide and quinidine on Kv4.2 currents

---

\*RC and MP contributed equally to this study and should be considered to share first authorship.

<sup>H</sup> Author for correspondence at: Research Center, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger Street East, Montreal, Quebec, H1T 1C8, Canada. Tel.: (514) 376-3330 ext. 3990; Fax: (514) 376-1355; E-mail: [nattel@icm.umontreal.ca](mailto:nattel@icm.umontreal.ca)

## **I- Summary**

- 1- The effects of flecainide and quinidine were studied on wild-type Kv4.2 channels (Kv4.2WT), channels with deletion of the N-terminal domain (N-del) and channels with mutations in the valine residues located at positions 402 and 404 in the presence (V[402,404]I) or in the absence (N-del/V[402,404]I) of the N-terminus.
- 2- The experiments were performed at 37°C on COS7 cells using the whole-cell configuration of the patch-clamp technique.
- 3- Flecainide and quinidine inhibited Kv4.2WT currents in a concentration-dependent manner ( $IC_{50}=23.6\pm 1.1$  and  $12.0\pm 1.4 \mu M$  at +50 mV, respectively), similar to their potency for the rest of the constructs at the same voltage. In Kv4.2WT channels, flecainide- and quinidine-induced block increased as channel inactivation increased. In addition, the inhibition produced by quinidine, but not by flecainide, increased significantly at positive test potentials. Similar effects were observed in N-del channels. However, in V[402,404]I and N-del/V[402,404]I channels the voltage-dependence of block by both quinidine and flecainide was lost, without significant modifications in potency at +50 mV.
- 4- These results point to an important role for S6 valines at positions 402 and 404 in mediating voltage-dependent block by quinidine and flecainide.

**Keywords:** K<sup>+</sup> currents; inactivation; patch-clamp; antiarrhythmic drugs

**Abbreviations:** DMEM, Dulbecco's modified Eagle medium; DMSO, dimethyl sulphoxide; G, conductance; GTP, guanosine triphosphate; I<sub>p</sub>, current amplitude; *k*, the slope factor of the activation/inactivation curve; Kv4.2WT, wild type Kv4.2 channels; N-del, Kv4.2 channels with a deletion in the N-terminus; N-del/V[402,404]I, channels with the N-terminal deletion and the valine mutations; n<sub>H</sub>, Hill coefficient;  $\tau_{fast}$ , time constant of the fast phase of inactivation;  $\tau_{slow}$ , time constant of the slow phase of inactivation; V[402,404]I, channels with valines at positions 402 and 404 mutated to isoleucines; V<sub>1/2</sub>, the midpoint of the activation/inactivation curve; V<sub>c</sub>, voltage command; V<sub>r</sub>, reversal potential of the current.

## II- Introduction

The voltage-dependent calcium-independent transient outward  $K^+$  current ( $I_{to1}$  or  $I_{tof}$ ) plays a key role in cardiac repolarization of several species including humans (Nerbonne, 2000). This current determines the initial phase of repolarization and influences the balance of inward and outward ionic currents during the plateau phase, modulating the voltage and time dependence of the cardiac action potential (Nattel, 1999; Nerbonne, 2000). Considerable experimental evidence has now been provided documenting a role for  $\alpha$ -subunits of the Kv4 subfamily in the generation of cardiac  $I_{tof}$  (Nerbonne, 2000). Thus, Kv4.2 channels are highly expressed in rat heart (Barry *et al.*, 1995) and Kv4.2 mRNA displays the same ventricular distribution as rat  $I_{tof}$ , increasing from endocardial to epicardial layers (Dixon & McKinnon, 1994). These channels generate transient outward currents, i.e. they display rapid activation and inactivation (Nerbonne, 2000). The molecular basis of the inactivation process in Kv4.2 channels remains unclear, supporting the hypothesis of a novel mechanism different from the N- and C-type shown for Shaker channels (Rasmusson *et al.*, 1998).

N-terminal deletion of Kv4.1 (Jerng & Covarrubias, 1997) and Kv4.2 channels (Zhu *et al.*, 1999; Bähring *et al.*, 2001; Pourrier *et al.*, 2002) slightly slows fast inactivation. A double mutation of valine residues located in the distal section of S6, a putative component of the inner mouth of the pore, to isoleucines (V[404,406]I in Kv4.1 and V[402,404]I in Kv4.2) shifts the voltage-dependence and slows the time course of inactivation (Pourrier *et al.*, 2002; Jerng *et al.*, 1999), while suppressing the blocking effects of 4-AP (Jerng *et al.*, 1999) both in the presence and absence of the N-terminal domain. Class I antiarrhythmic drugs characteristically block cardiac  $Na^+$  channels, but some of them also prolong action potential duration by blocking one or more  $K^+$  channels (Nattel, 1999). It has been shown that flecainide and quinidine inhibit  $I_{tof}$  in native cells (Imaizumi & Giles, 1987; Slawsky & Castle, 1994; Wang *et al.*, 1995) as well as in heterologous expression systems (Yeola & Snyders, 1997; Rolf *et al.*, 2000). The effects of quinidine are consistent with open-channel block (Imaizumi & Giles, 1987; Wang *et al.*, 1995), whereas flecainide seems to exhibit a higher affinity for the inactivated state (Wang *et al.*, 1995).

Information about the molecular determinants of the blocking effects of flecainide and quinidine on  $I_{toF}$  is limited. We are not aware of studies characterizing the effects of interventions altering Kv4.2 channel inactivation on flecainide or quinidine action. The present work was designed to investigate the effects of flecainide and quinidine on Kv4.2 currents transiently expressed in COS7 cells and to analyze whether the observed effects are affected by modifications altering channel inactivation. We studied the effects of flecainide and quinidine on Kv4.2 wild-type channels (Kv4.2WT), on channels with a deletion of the N-terminal domain (N-del) and on channels with mutations in the valine residues located in positions 402 and 404 in the presence (V[402,404]I) or absence of the N-terminal domain (N-del/V[402,404]I). The present results demonstrate that flecainide and quinidine block Kv4.2WT and all the studied constructs with the same potency at a positive voltage, but that the absence of the S6 valine residues located at positions 402 and 404 abolishes the voltage-dependence of block. Preliminary results have been previously published in abstract form (Caballero *et al.*, 2001).

### **III- Methods**

#### **III-1 Molecular biology**

Wild-type rat Kv4.2 was cloned into pRc/CMV vector (Invitrogen) between Hind III and Not I sites. The N-terminal deletion ( $\Delta 2-151$ ), the V(402,404) mutations and the combination of both (N-del/V[402,404]I) were generated as previously described (Pourrier *et al.*, 2002) and then were cloned into pTarget vector (Promega). Wild-type and mutant channels were subsequently transfected into COS7 cells for electrophysiological studies.

#### **III-2 Cell culture and transfection**

Cell culture and transfection methods have been previously described in detail (Pourrier *et al.*, 2002). COS7 cells were co-transfected with the construct of interest ( $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) and CD8 antigen ( $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) expression plasmids using Lipofectamine

(Gibco). After 48 h, cells were removed from the plates and incubated in BSA (bovine serum albumin) solution containing Dynabeads M450 conjugated to CD8 antibody ( $1 \mu\text{l ml}^{-1}$ ) (Dynal). Dynabead adhesion to the cell surface was used to select successfully-transfected cells (Jurman *et al.*, 1994).

### III-3 Solutions

Cells were perfused with Tyrode's solution containing (mM): NaCl 136, KCl 5.4,  $\text{MgCl}_2$  1, HEPES 5,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.3,  $\text{CaCl}_2$  1 and glucose 10 (pH 7.4, NaOH). The intracellular solution contained (mM): GTP 1, K-Aspartate 110, KCl 20,  $\text{MgCl}_2$  1, ATP-Mg 5, HEPES 10, EGTA 5 and phosphocreatine 5 (pH 7.3, KOH). BSA solution contained (mM): NaCl 155, KCl 5,  $\text{MgCl}_2$  1, HEPES 10,  $\text{CaCl}_2$  3 and BSA 0.5% (pH was adjusted to 7.4 with NaOH). Flecainide and quinidine were dissolved in DMSO to obtain 10 mM stock solutions

### III-4 Data acquisition and analysis

Currents were recorded using the whole-cell configuration of the patch clamp technique. Glass pipettes had a tip resistance of 2-3  $\text{M}\Omega$  when filled with internal solution and immersed in external solution. Series resistance ( $R_s$ ) averaged  $5.0 \pm 0.4 \text{ M}\Omega$  ( $n=27$ ), the capacitive time-constant ( $\tau_c$ ) averaged  $206.9 \pm 20.4 \mu\text{s}$  and membrane capacitance was  $42.1 \pm 3.5 \text{ pF}$ .  $R_s$  and  $\tau_c$  were compensated (80-95%) and the voltage drop across the series resistance was  $<5 \text{ mV}$ . Data were acquired and analyzed using an Axopatch 200A amplifier and pCLAMP 6.0 software (Axon Instruments). All experiments were performed at  $37^\circ\text{C}$ . Current amplitude was measured as the difference between peak outward and end-pulse current. Block was fitted to the equation;

$$Y = 1 / \{1 + (\text{IC}_{50}/X)^{n_H}\},$$

where Y is the fractional block at concentration X,  $\text{IC}_{50}$  the concentration that produces half-maximal block and  $n_H$  the Hill coefficient. The activation and inactivation curves were obtained as previously described (Jerng *et al.*, 1999; Pourrier *et al.*, 2002) and were fitted with a Boltzmann equation;

$$y = 1/\{1 + \exp [(V_{1/2} - V)/k]\},$$

where  $V_{1/2}$  is the voltage for half-maximum activation or inactivation,  $V$  the potential of the test (for activation) or conditioning (for inactivation) pulse and  $k$  is the slope factor.

The voltage dependence of block was fitted using the Woodhull formalism;

$$f = [D]/\{[D] + K_D^* \exp(-z\delta FE/RT)\},$$

where  $z$ ,  $F$ ,  $R$ , and  $T$  have their usual meaning,  $\delta$  represents the fractional electrical distance from the intracellular side of the membrane, and  $K_D^*$  represents the dissociation constant at the reference potential (0 mV).

Data are expressed as the mean $\pm$ s.e. Statistical comparisons were performed with ANOVA with a Newman-Keuls multiple-comparison post-hoc test.  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## **IV- Results**

### **IV-1 Effects of flecainide and quinidine on Kv4.2 currents**

Figures 1 and 2 show typical recordings of Kv4.2WT, N-del, V[402,404]I and N-del/V[402,404]I currents during 500 ms-pulses from -80 mV to +50 mV, in the absence and in the presence of 10  $\mu$ M flecainide and quinidine, respectively. Kv4.2WT currents rose rapidly to a peak ( $1341 \pm 255$  pA,  $n=28$ ) and inactivated rapidly. Two exponential components were required to describe the time course of inactivation ( $\tau_{fast}=6.5 \pm 1.0$  ms,  $\tau_{slow}=70.9 \pm 17.7$  ms,  $n=28$ ). Flecainide (Figure 1a) decreased the current amplitude by  $44.4 \pm 3.1\%$  ( $n=7$ ) but did not modify the time course of inactivation ( $\tau_{fast}=6.1 \pm 1.1$  ms and  $\tau_{slow}=55.2 \pm 7.5$  ms,  $n=5$ ,  $P=NS$ , Figures 1e and f). Figure 1b shows the effects of flecainide on N-del currents. In this construct, rapid-phase inactivation was significantly slower than for Kv4.2WT (Table 1). In the presence of flecainide, inactivation kinetics were not significantly changed (Figures 1e and f) and current inhibition was similar to that for Kv4.2WT ( $46.1 \pm 6.9\%$  at +50 mV,  $n=10$ ,  $P=NS$  vs Kv4.2WT). For V[402,404]I, rapid-phase inactivation was also slower compared with Kv4.2WT (Figure 1c, Table 1). Flecainide decreased current amplitude by  $46.5 \pm 8.4\%$  ( $n=5$ ,  $P=NS$  vs Kv4.2WT and



N-del) and did not alter  $\tau_{\text{fast}}$  ( $5.5 \pm 0.7$  vs  $7.8 \pm 1.2$  ms,  $n=5$ ,  $P=\text{NS}$ ) or  $\tau_{\text{slow}}$  ( $86.4 \pm 9.0$  vs  $71.2 \pm 9.2$  ms,  $P=\text{NS}$ ). In N-del/V[402,404]I (Figure 1d), both rapid- and slow-phase inactivation were slowed (Table 1). Flecainide accelerated fast-phase ( $\tau_{\text{fast}}=7.8 \pm 1.1$  ms,  $n=12$ , vs  $21.6 \pm 2.1$  ms control,  $P<0.05$ ) but did not significantly modify slow-phase inactivation ( $\tau_{\text{slow}}=105.8 \pm 13.3$ ,  $P=\text{NS}$ , Figures 1e and f), while inhibiting the current by  $51.2 \pm 3.7\%$  at +50 mV ( $n=9$ ,  $P=\text{NS}$  vs Kv4.2WT, N-del and V[402,404]I).

Figure 2 shows the effects of  $10 \mu\text{M}$  quinidine on Kv4.2 currents. Quinidine decreased Kv4.2WT current by  $49.3 \pm 6.0\%$  ( $n=8$ , Figure 2a) and accelerated fast-phase inactivation, decreasing  $\tau_{\text{fast}}$  from  $5.9 \pm 0.8$  to  $3.4 \pm 0.2$  ms ( $n=7$ ,  $P<0.05$ , Figure 2e). Quinidine did not modify slow-phase inactivation ( $\tau_{\text{slow}}=76.6 \pm 16.0$  vs  $79.4 \pm 16.1$ ,  $P=\text{NS}$ , Figure 2f). In N-del (Figure 2b), quinidine reduced the current by  $45.0 \pm 2.6\%$  ( $n=8$ ,  $P=\text{NS}$  vs Kv4.2WT) and decreased  $\tau_{\text{fast}}$  from  $9.5 \pm 1.6$  to  $5.8 \pm 0.7$  ms ( $n=8$ ,  $P<0.05$ ) but did not modify  $\tau_{\text{slow}}$  ( $85.7 \pm 13.2$  ms vs  $86.1 \pm 13.5$  ms,  $P=\text{NS}$ , Figures 2e and f). In V[402,404]I (Figure 2c), the drug decreased current amplitude by  $40.4 \pm 8.3\%$  ( $n=6$ ,  $P=\text{NS}$  vs Kv4.2WT and N-del), accelerated fast-phase inactivation, decreasing  $\tau_{\text{fast}}$  from  $8.7 \pm 2.4$  to  $4.1 \pm 0.2$  ms ( $n=5$ ,  $P<0.05$ ), and did not affect  $\tau_{\text{slow}}$  ( $121.6 \pm 13.6$  vs  $92.7 \pm 10.9$  ms,  $P=\text{NS}$ , Figures 2e and f). Figure 2d shows the effects of quinidine on N-del/V[402,404]I. In control conditions,  $\tau_{\text{fast}}$  and  $\tau_{\text{slow}}$  values were  $24.8 \pm 2.6$  ( $n=9$ ,  $P<0.05$  vs Kv4.2WT) and  $143.6 \pm 20.6$  ms ( $P=\text{NS}$ ), respectively, and quinidine decreased  $\tau_{\text{fast}}$  to  $12.4 \pm 2.8$  ms ( $P<0.01$ ), without modifying  $\tau_{\text{slow}}$  ( $146.5 \pm 15.1$  ms,  $P=\text{NS}$ , Figures 2e and f).

#### IV-2 Concentration-dependent effects of flecainide and quinidine on Kv4.2 currents

The concentration-response curves for flecainide and quinidine on Kv4.2WT, N-del, V[402,404]I and N-del/V[402,404]I currents at +50 mV are shown in Figure 3. The percentage of block at +50 mV for each construct was plotted as a function of the drug concentration and fitted to a dose-response relationship (see Methods). Flecainide (a) and quinidine (b) clearly inhibited Kv4.2 currents in a concentration-dependent manner. The  $\text{IC}_{50}$  values were not significantly different,

averaging  $23 \pm 1.1 \mu\text{M}$  for Kv4.2WT ( $n_H = 1.1 \pm 0.1$ ),  $12.1 \pm 2.6 \mu\text{M}$  for N-del ( $n_H = 0.6 \pm 0.5$ ),  $14.5 \pm 1.9 \mu\text{M}$  for V[402,404]I ( $n_H = 0.7 \pm 0.5$ ) and  $11.1 \pm 1.0 \mu\text{M}$  for N-del/V[402,404]I ( $n_H = 1.4 \pm 0.08$ ), respectively. For quinidine, the  $\text{IC}_{50}$  values averaged  $12.2 \pm 2.2 \mu\text{M}$  for Kv4.2WT ( $n_H = 0.5 \pm 0.3$ ),  $12.3 \pm 1.5 \mu\text{M}$  for N-del ( $n_H = 0.95 \pm 0.4$ ),  $19.1 \pm 1.2 \mu\text{M}$  for V[402,404]I ( $n_H = 1.3 \pm 0.3$ ) and  $33.4 \pm 1.5 \mu\text{M}$  for N-del/V[402,404]I channels ( $n_H = 1.2 \pm 0.5$ ) ( $P = \text{NS}$  for  $\text{IC}_{50}$  and  $n_H$  among constructs). Overall, the results suggest that the potency of block by flecainide and quinidine was not significantly different at +50 mV among the various constructs studied.

### IV-3 Voltage-dependent effects of flecainide and quinidine on Kv4.2 currents

Flecainide ( $10 \mu\text{M}$ ) significantly inhibited Kv4.2WT current at all potentials positive to -10 mV. Figure 4a shows the normalized conductance-voltage curves of Kv4.2WT channels in the absence and the presence of flecainide, with conductance ( $G$ ) at each voltage normalized to the maximum conductance ( $G_{\text{max}}$ ) in each experiment. Boltzmann fitting yielded a mean midpoint ( $V_{1/2}$ ) of  $-6.9 \pm 5.7$  mV,  $n = 4$  and slope factor ( $k$ ) of  $12.1 \pm 1.5$  mV. Flecainide did not modify  $k$  ( $11.6 \pm 1.8$  mV,  $n = 4$ ,  $P = \text{NS}$ ) or  $V_{1/2}$  ( $-13.1 \pm 7.7$  mV,  $P = \text{NS}$ ). In Figure 4b, normalized-inactivation curves in the absence and presence of flecainide are shown. The current amplitude elicited by 500 ms-test pulses to +60 mV was plotted as a function of conditioning pulse voltage and normalized to maximum current amplitude ( $I_{\text{max}}$ ). In control, inactivation curves had  $V_{1/2}$  and  $k$  values of  $-57.1 \pm 3.4$  mV and  $8.4 \pm 1.5$  mV, respectively, while in the presence of flecainide, these values were  $-66.0 \pm 4.0$  and  $8.9 \pm 1.4$  mV ( $n = 4$ ,  $P = \text{NS}$ ).

Figure 4c shows the relationships between block and the voltage-dependence of inactivation and activation of Kv4.2WT channels. To relate the voltage-dependence of drug-induced block to the voltage-dependence of Kv4.2WT inactivation, the ratio between the current amplitude obtained with pulses to +60 mV after prepulses from -100 to -40 mV in the presence vs absence of flecainide was plotted as a function of the voltage of the conditioning pulse. The blocking effect of flecainide increased at more positive prepulse potentials ( $9.6 \pm 8.7\%$  at -100 mV vs

69.6±24.1% at -40 mV,  $n=4$ ,  $P<0.05$ ), i.e., blockade became more pronounced as the fraction of inactivated channels increased. To relate the voltage-dependence of block to Kv4.2WT channel activation, the ratio between the current amplitude during 500 ms-pulses in the presence vs the absence of flecainide was plotted as a function of the test potential. The blocking effects of flecainide were apparent at potentials positive to -10 mV, increasing slightly but not significantly to 40.4±2.1% at +10 mV and did not change further at more positive potentials (42.6±3.1% at +50 mV,  $n=4$ ).

Quinidine significantly inhibited the current at potentials positive to -20 mV, did not modify the activation voltage ( $V_{1/2}=-1.0±1.8$  mV vs  $-3.8±4.7$  mV,  $n=4$ ,  $P=NS$ ), but increased the  $k$  value for activation from 10.9±4.0 mV to 14.4±1.2 mV ( $P<0.05$ ) (Figure 4d). Quinidine did not modify  $k$  (7.2±1.4 mV vs 7.5±0.6 mV) or  $V_{1/2}$  ( $-60.4±2.6$  mV vs  $-54.5±1.1$  mV,  $n=4$ ,  $P=NS$ ) of inactivation (Figure 4e). In contrast to flecainide, quinidine-induced block did not change in the presence of prepulses to potentials between -100 and -70 mV. However, the blockade increased significantly at more positive preconditioning potentials, reaching 55.5±11.5% at -50 mV ( $n=4$ ,  $P<0.05$  vs blockade at -100 mV). When quinidine's blocking effects during test pulses to different voltages were related to the voltage-dependence of activation (Figure 4f) blockade was small at -20 mV (4.6±21.9%,  $n=4$ ) and steeply increased as the voltage of the pulse became more positive, even for voltages at which channel opening reached saturation (between +20 and +50 mV e.g. 47.1±3.7% at +50 mV,  $n=4$ ,  $P<0.05$ ). Applying the Woodhull equation to results at voltages with maximal activation ( $\geq 10$  mV), a fractional electrical distance ( $\delta$ ) of 0.9 was obtained for the quinidine binding site.

Figure 5 illustrates the voltage-dependent effects of flecainide and quinidine on N-del channels. The N-terminal deletion did not modify the voltage-dependence of activation or inactivation as compared to Kv4.2WT (Table 1). Figures 5a and d show the activation curves obtained in control conditions and in the presence of flecainide and quinidine, respectively. Flecainide did not modify the voltage-dependence of activation ( $V_{1/2}=-1.6±5.2$  vs  $-3.7±3.3$  mV and  $k=15.1±7.4$  vs  $15.4±7.5$ ,  $n=4$ ,  $P=NS$ ), whereas quinidine did not modify  $k$  (10.4±1.8 vs 13.7±1.7 mV,  $n=4$ ,  $P=NS$ ), but shifted  $V_{1/2}$  in the negative direction ( $-11.4±1.9$  vs  $0.7±1.7$ ,  $P<0.05$ ). Figures 5b and e show that, for this construct, neither flecainide ( $V_{1/2}=-54.5±1.3$  vs  $-50.5±4.4$  mV,

$n=4$ ,  $P=NS$ ) nor quinidine ( $V_{1/2}=-54.8\pm3.7$  vs  $-49.2\pm3.0$  mV,  $n=4$ ,  $P=NS$ ) modified the voltage-dependence of inactivation. As for Kv4.2WT, flecainide-induced block did not significantly change in the range of channel activation (Figure 5c). Flecainide-induced block increased as the prepulse became more positive (e.g.  $59.5\pm18.1\%$  at  $-40$  mV,  $n=4$ ,  $P<0.05$  vs  $35.5\pm13.6\%$  blockade at  $-100$  mV). The voltage-dependence of quinidine-induced block was not modified by the deletion of the N-terminus (Figure 5f). Blockade was more pronounced as the amount of activated ( $2.8\pm29.8\%$  at  $0$  mV vs  $40.4\pm3.7\%$  at  $+50$  mV,  $n=4$ ) and inactivated ( $40.5\pm11.2\%$  with prepulses to  $-100$  mV vs  $64.0\pm19.1\%$  with prepulses to  $-50$  mV) channels increased. The fractional electrical distance was not altered.

Figure 6 summarizes the voltage-dependence of flecainide and quinidine effects on V[402,404]I. This mutation shifted the  $V_{1/2}$  of the activation curve in the positive direction (Table 1). Neither flecainide ( $V_{1/2}=14.3\pm5.9$  vs  $13.3\pm5.6$  mV,  $n=4$ ,  $P=NS$ ) nor quinidine ( $V_{1/2}=15.2\pm2.9$  vs  $13.9\pm2.9$  mV,  $n=4$ ,  $P=NS$ ) modified the voltage-dependence of activation (Figures 6a and d). As previously described (Pourrier *et al.*, 2001; Jerng *et al.*, 1999), substitution of the valine residues located in positions 402 and 404 by isoleucines shifted the inactivation curve to more positive potentials (Table 1). Neither flecainide ( $V_{1/2}=-36.6\pm8.1$  vs  $-35.8\pm8.5$  mV,  $n=4$ ,  $P=NS$ ) nor quinidine ( $V_{1/2}=-47.0\pm9.7$  vs  $-40.0\pm7.5$  mV,  $n=4$ ,  $P=NS$ ) modified the voltage-dependence of inactivation. In contrast to Kv4.2WT, drug-induced block of V[402,404]I showed no significant voltage-dependence (Figures 6c and f). Thus, the blocking effects of both drugs were similar when prepulses to  $-100$  mV ( $47.5\pm8.4\%$  and  $35.6\pm4.1\%$  for flecainide and quinidine, respectively) or to  $-50$  mV were applied ( $51.9\pm7.2\%$  and  $39.2\pm11.2\%$ ,  $n=4$ ,  $P=NS$ ). Similarly, the same amount of block was obtained when pulses to  $0$  mV ( $62.7\pm3.4\%$  and  $47.6\pm11.6\%$  for flecainide and quinidine, respectively) and to  $+50$  mV ( $48.5\pm11.6$  and  $43.7\pm4.7$ ,  $n=4$ ,  $P=NS$ ) were applied.

Figure 7 shows the effects of flecainide and quinidine on N-del/V[402,404]I. For this construct, the  $V_{1/2}$  of the activation curve was not significantly altered (Table 1). Both drugs shifted the activation  $V_{1/2}$  to slightly more positive potentials (by  $4.3\pm3.5$  mV for flecainide,  $n=4$ ,  $P=NS$  and  $16.2\pm3.3$  mV for quinidine,  $n=4$ ,  $P<0.05$ , Figures 7a and d), without modifying  $k$  ( $9.8\pm0.8$  mV vs  $10.2\pm1.8$  mV for flecainide

and  $15.6 \pm 4.1$  vs  $12.3 \pm 0.7$  mV for quinidine,  $P=NS$ ). The inactivation voltage-dependence of N-del/V[402,404]I was shifted positively (Table 1). Neither flecainide nor quinidine modified the voltage-dependence of channel inactivation (Figures 7b and e).

As for V[402,404]I, drug-induced blockade did not increase as the fraction of inactivated channels increased (Figures 7c and f). Thus, flecainide inhibited the current by  $39.2 \pm 16.7\%$  and  $44.6 \pm 7.0\%$  at -100 mV and -50 mV, respectively ( $n=4$ ,  $P=NS$ ) and quinidine by  $39.3 \pm 11.4\%$  and  $52.3 \pm 16.0\%$ , respectively ( $n=4$ ,  $P=NS$ ). Similarly, there was no statistically-significant change in block with either flecainide or quinidine over the activation range of the current.

## **V- Discussion**

In this study we found that: 1) flecainide and quinidine inhibit Kv4.2 currents in a concentration- and voltage-dependent manner, but with significant differences between their voltage-dependent blocking properties; 2) deletion of the N-terminus does not modify qualitatively any of the drug effects; and 3) valine to isoleucine mutations at positions 402 and 404 eliminate voltage-dependence of flecainide and quinidine block.

### **V-1 Comparison with previous studies of the effects of quinidine and flecainide on $I_{to}$ -like currents**

We found that flecainide and quinidine inhibit Kv4.2WT currents at +50 mV with  $IC_{50}$ s of  $23.6 \mu M$  and  $12 \mu M$ , respectively. These values are consistent with previous reports in native cells and heterologous expression systems. In rat ventricular myocytes, flecainide and quinidine inhibit  $I_{to}$  with  $IC_{50}$ s of  $3.7$  and  $3.9 \mu M$ , respectively (Slawsky & Castle, 1994). In human atrial myocytes,  $10 \mu M$  flecainide and quinidine inhibit  $I_{to}$  by 40% and 60%, respectively (Wang *et al.* 1995), while in *Ltk* cells they inhibit Kv4.2 currents by ~50% (Yeola & Snyders, 1997). Quinidine consistently accelerates inactivation (Slawsky & Castle, 1994; Wang *et al.*, 1995; Yeola & Snyders, 1997), and block increases over the activation voltage range (Wang

*et al.*, 1995) but is not increased by depolarising prepulses (Wang *et al.*, 1995), suggesting open-state block. The state-dependence of flecainide-induced block of  $I_{to}$  has been more controversial. Flecainide acceleration of inactivation suggests open-channel block (Slawsky & Castle, 1994). However, in human atrium, flecainide block is enhanced by depolarizing prepulses, does not show use-dependence and does not increase with channel opening, suggesting a preferential inactivated-state drug interaction (Wang *et al.*, 1995).

In our study quinidine, but not flecainide, accelerated the inactivation kinetics of Kv4.2WT channels, suggesting preferential open-channel block for quinidine but not flecainide. Quinidine, but not flecainide, block increased over the activation voltage range, again consistent with open-state block for quinidine only. At more positive potentials, when the channels were fully open, only quinidine-induced block increased significantly. For both flecainide and quinidine, the intensity of block increased with stronger depolarizing prepulses, compatible with inactivated-state block.

### **V-2 Novel aspects and potential significance**

Antiarrhythmic drugs inhibit  $I_{to}$  and this action is believed to contribute to their antiarrhythmic properties (Imaizumi & Giles, 1987; Duan *et al.*, 1992; Slawsky & Castle, 1994; Wang *et al.*, 1995; Feng *et al.*, 1997; Nattel, 1999; Sánchez-Chapula, 1999). They are also well-known to produce time- and voltage-dependent  $I_{to}$  block (Imaizumi & Giles, 1987; Slawsky & Castle, 1994; Wang *et al.*, 1995; Sánchez-Chapula, 1999). Voltage-dependent block is generally interpreted as indicating state-dependent action (Snyders *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1995). Block that increases with depolarizing prepulses over the inactivation voltage range is often interpreted as reflecting preferential inactivated-state interaction (Wang *et al.*, 1995), whereas block that increases over the voltage range of activation is generally interpreted as open channel block (Snyders *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1995).

The present study is, to our knowledge, the first detailed study of quinidine and flecainide block of Kv4.2 currents. In addition, it is the first of which we are aware to report on structural factors affecting voltage-dependent Kv4.2 block.

Although both mutations involving V[402,404]I slowed inactivation and affected the voltage-dependence of inactivation, both processes remained qualitatively intact. N-del/V[402,404]I slowed inactivation much more than V[402,404]I and V[402,404]I produced a depolarising shift of activation voltage-dependence, which was not altered by N-del/V[402,404]I. In addition, neither mutation significantly altered drug effects on the voltage dependence of activation or inactivation or on inactivation kinetics. Nevertheless, the very clear voltage-dependencies observed when positions 402 and 404 were occupied by valines were lost upon mutation to isoleucine, suggesting that voltage-dependent behaviour is not due to preferential drug binding to open or inactivated channel states per se, but to a voltage-dependent interaction involving the terminal S6 valine moieties. The 402 and 404 valines may play a critical role in determining the response of the drug-receptor conformation to changing voltage fields. It has been previously described that the replacement of the Kv1.4 sequence in the cytoplasmic half of S6 with that of Kv4.2 converted the open-state 4AP block to rested-state block (Tseng, 1999), pointing to a key role of this region in the drug-channel interaction. We have observed that the V[402,404]I mutation alone is sufficient to produce this behaviour (Caballero *et al.*, 2001), consistent with a role of S6 valines in determining the voltage-dependence of the conformation of the drug binding site.

Kv4 channel inactivation induced by prepulses at negative potentials may be mechanistically different from inactivation at positive potentials upon depolarization (Jerng *et al.*, 1999). Kv4.2 channels can inactivate from the open state at strongly depolarized voltages or directly from closed states at more negative potentials (Bähring *et al.*, 2001). We therefore cannot rule out the possibility that the S6 valine mutations, which shift the inactivation curve in the positive direction, increase closed-state inactivation and thereby alter drug-induced block, particularly upon depolarizing prepulses. The effect of V402 and 404 on prepulse-related voltage dependent drug-induced block does not necessarily imply that V402 and 404 play a role in drug interactions during open-inactivated state transitions. Indeed, the effects of quinidine on inactivation rate at +50 mV were unaltered by the V[402,404]I mutations.

Quinidine's block increased with more positive test pulses beyond the voltage range for full activation (Figures 4f and 5f). Such behaviour has generally been

interpreted as indicating a blocking site in the voltage field, allowing for an estimation of the dielectric distance of the presumed binding site (Snyders *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1995; Yeola *et al.*, 1996). We used the Woodhull formalism to calculate the electrical distance of the quinidine blocking site in Kv4.2WT and N-del, and estimated that is at a site exposed to  $\approx 90\%$  of the transmembrane voltage gradient (considering that drug access is from the inner mouth of the pore, (Figures 4f and 6f). The voltage-dependent behaviour was eliminated by the V[402,404]I mutations suggesting either a dramatic change in the blocking site caused by the mutation (altered binding site) or that the voltage-dependent behaviour of quinidine-block at positive potentials is not due to a voltage effect on ionized drug molecules per se but to a voltage-dependent rearrangement of the drug binding site requiring the presence of the S6 valines (effects on access to or within the binding site). Further studies are clearly needed to clarify the mechanisms underlying voltage-dependent drug block of Kv4.2.

## **VI- Acknowledgments**

The Kv4.2 clone was kindly provided by Dr. Jeanne Nerbonne. The authors thank Chantal St. Cyr for excellent technical assistance and Diane Campeau for fine secretarial work. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research and by the Quebec Heart and Stroke Foundation. Ricardo Caballero was a fellow of the Spanish Ministry of Education (SAF96/ 0042).



## VII- References

BÄHRING, R., BOLAND, L.M., VARGHESE, A., GEBAUER, M. & PONGS, O. (2001). Kinetic analysis of open- and closed-state inactivation transitions in human Kv4.2 A-type potassium channels. *J. Physiol.*, **535**, 65-81.

BARRY, D.M., TRIMMER, J.S., MERLIE, J.P. & NERBONNE, J.M. (1995). Differential expression of voltage-gated K<sup>+</sup> channel subunits in adult rat heart. Relation to functional K<sup>+</sup> channels? *Circ. Res.*, **77**, 361-369.

CABALLERO, R., POURRIER, M., SCHRAM, G., DELPON, E., TAMARGO, J. & NATTEL, S. (2001). A critical role for S6 valines in the pharmacological properties of transient outward current I<sub>to</sub> carried by Kv4.2 subunits. *Circulation*, **104** (Suppl. II), 217.

DIXON, J.E. & MCKINNON, D. (1994). Quantitative analysis of mRNA expression in atrial and ventricular muscle of rats. *Circ. Res.*, **75**, 252-260.

DUAN, D., FERMINI, B. & NATTEL, S. (1992). Potassium channel blocking properties of propafenone in rabbit atrial myocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **264**, 1113-1123.

FENG, J., WANG, Z., LI G.R. & NATTEL, S. (1997). Effects of class III antiarrhythmic drugs on transient outward and ultra-rapid delayed rectifier currents in human atrial myocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **281**, 384-392.

IMAIZUMI, Y. & GILES, W.R. (1987). Quinidine-induced inhibition of transient outward current in cardiac muscle. *Am. J. Physiol.*, **253**, H704-H708.

JERNG, H.H. & COVARRUBIAS, M. (1997) K<sup>+</sup> channel inactivation mediated by the concerted action of the cytoplasmic N- and C- terminal domains. *Biophys. J.*, **72**, 163-174.

JERNG, H.H., SHAHIDULLAH, M. & COVARRUBIAS, M. (1999). Inactivation gating of Kv4 potassium channels. Molecular interactions involving the inner vestibule of the pore. *J. Gen. Physiol.*, **113**, 641-659.

JURMAN, M.E., BOLAND, L.M., LIU, Y. & YELLEN, G. (1994). Visual identification of individual transfected cells for electrophysiology using antibody-coated beads. *Biotechniques*, **17**, 876-881.

NATTEL, S. (1999). The molecular and ionic specificity of antiarrhythmic drug actions. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.*, **10**, 272-282.

NERBONNE, J.M. (2000). Molecular basis of functional voltage-gated K<sup>+</sup> channel diversity in the mammalian myocardium. *J. Physiol.*, **525**, 285-298.

POURRIER, M., CABALLERO, R., SCHRAM, G., WANG, Z. & NATTEL, S. (2002). Molecular correlates of rapid inactivation of Kv4.2 potassium channels. *Pflugers Arch. – Eur. J. Physiol.* (submitted).

RASMUSSEN, R.L., MORALES, M.J., WANG, S., LIU, S., CAMPBELL, D.L., BRAHMAJOTHI, M.V. & STRAUSS, H.C. (1998) Inactivation of voltage-gated cardiac K<sup>+</sup> channels. *Circ. Res.*, **82**, 739-750.

ROLF, S., HAVERKAMP, W., BORGGREFE, M., MUHOFF, U., ECKARDT, L., MERGENTHALER, J., SNYDERS, D.J., PONGS, O., SPECKMANN, E.J., BREITHARDT, G. & MADEJA, M. (2000). Effects of antiarrhythmic drugs on cloned cardiac voltage-gated potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **362**, 22-31.

SANCHEZ-CHAPULA, J.A. (1999). Mechanism of transient outward K<sup>+</sup> channel block by disopyramide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **290**, 515-523.

SLAWSKY, M.T. & CASTLE, N.A. (1994). K<sup>+</sup> channel blocking actions of flecainide compared with those of propafenone and quinidine in adult rat ventricular myocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **269**, 66-74.

SNYDERS, D.J., KNOTH, K.M., ROBERDS, S.L. & TAMKUN, M.M. (1992). Time-voltage- and state-dependent block by quinidine of a cloned human cardiac potassium channel. *Mol. Pharmacol.*, **41**, 322-330.

TSENG, G.N. (1999). Different state dependencies of 4-aminopyridine binding to rKv1.4 and rKv4.2: role of the cytoplasmic halves of the fifth and sixth transmembrane segments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **290**, 569-577.

WANG, Z., FERMINI, B. & NATTEL, S. (1995). Effects of flecainide, quinidine, and 4-aminopyridine on transient outward and ultrarapid delayed rectifier currents in human atrial myocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **272**, 184-196.

YEOLA, S.W., RICH, T., UEBELE, V., TAMKUN, M.M. & SNYDERS, D.J. (1996). Molecular analysis of a binding site for quinidine in a human cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> channel. Role of S6 in antiarrhythmic drug binding. *Circ. Res.*, **78**, 1105-1114.

YEOLA, S.W. & SNYDERS, D.J. (1997). Electrophysiological and pharmacological correspondence between Kv4.2 current and rat cardiac transient outward current. *Cardiovasc. Res.*, **33**, 540-547.

ZHU, X.R., WULF, A., SCHWARZ, M., ISBRANDT, D. & PONGS, O. (1999). Characterization of human Kv4.2 mediating a rapidly-inactivating transient voltage-sensitive K<sup>+</sup> current. *Receptors Channels*, **6**, 387-400.

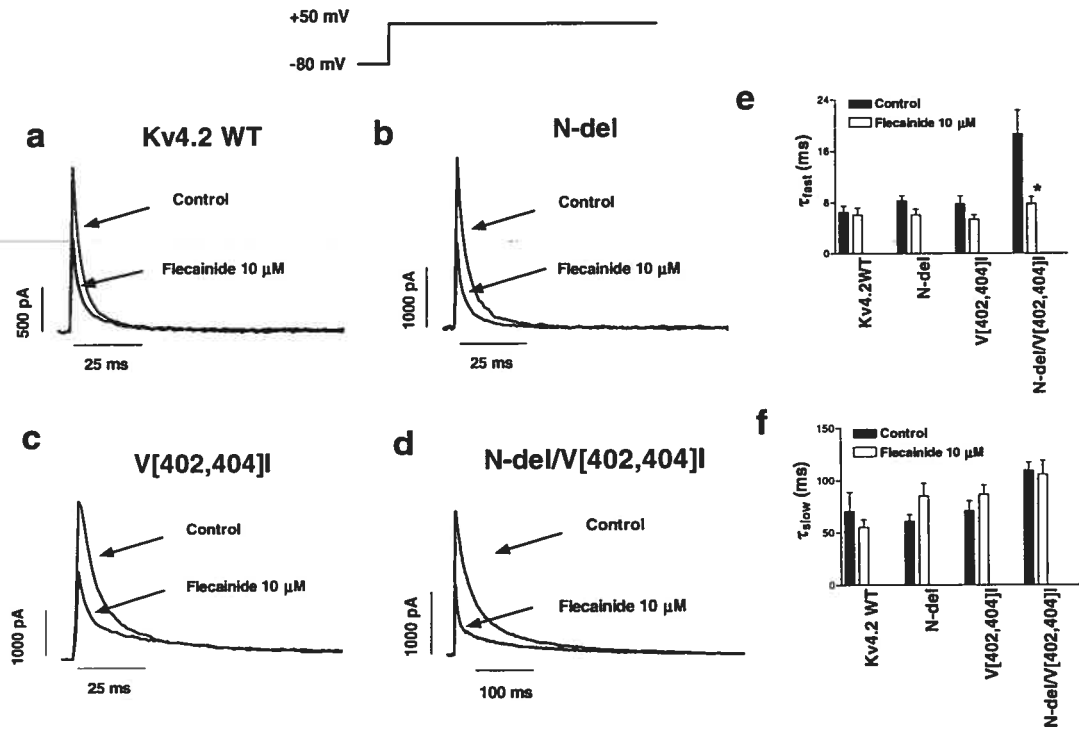
**VIII- Tables**

<i>Construct</i>	<i>Inactivation kinetics</i>		<i>Voltage-dependence of activation</i>		<i>Voltage-dependence of inactivation</i>	
	$\tau_f$ (ms)	$\tau_s$ (ms)	$V_{1/2}$ (mV)	$k$ (mV)	$V_{1/2}$ (mV)	$k$ (mV)
Kv4.2WT	6.0±0.6	74.1±10.7	-5.8±4.2	11.7±1.0	-56.0±1.9	8.3±0.9
N-del	8.8±0.8**	71.2±6.9	-1.4±2.0	14.4±3.4	-49.9±2.5	8.7±0.9
V[402,404]I	8.1±1.2*	81.7±6.9	13.0±3.7**	9.9±1.1	-38.4±5.0**	7.8±1.1
N-del/ V[402,404]I	21.6±2.1***	130.2***	-0.4±2.8	13.3±2.0	-42.9±3.0**	20.5±1.5***

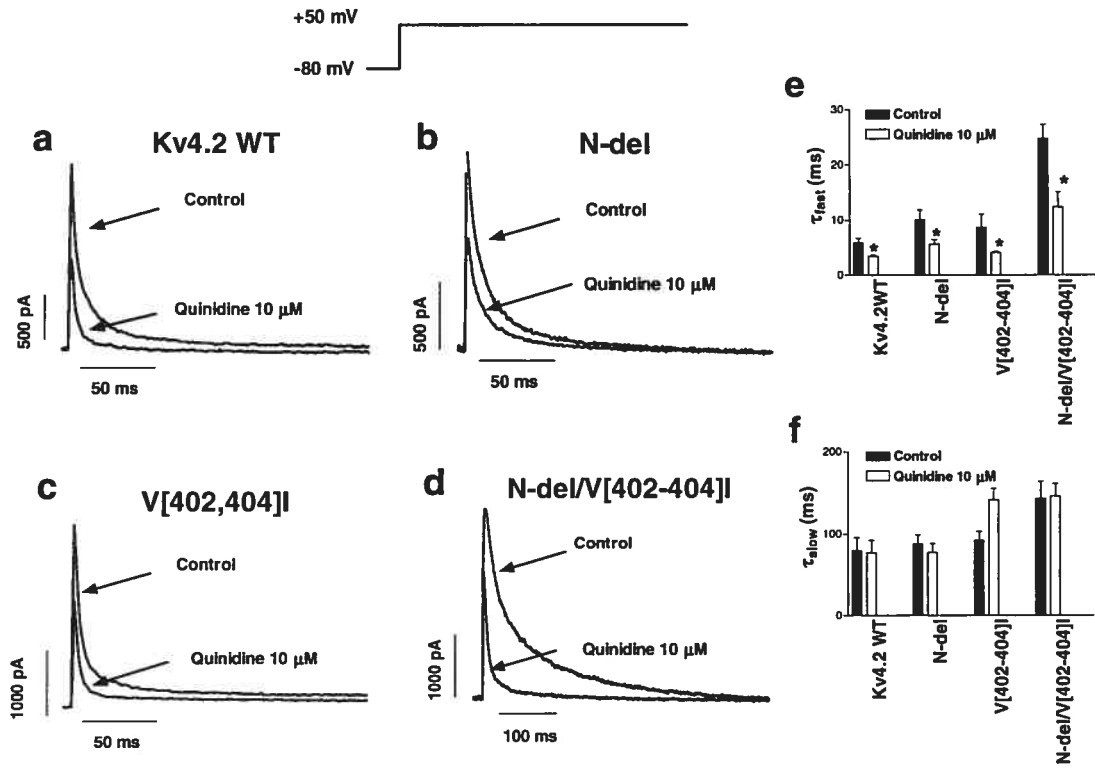
**Table 1:** Inactivation kinetics and voltage-dependence of the activation and inactivation on Kv4.2WT and N-del, V[402,404]I and N-del/V[402,404]I mutants

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs Kv4.2WT.

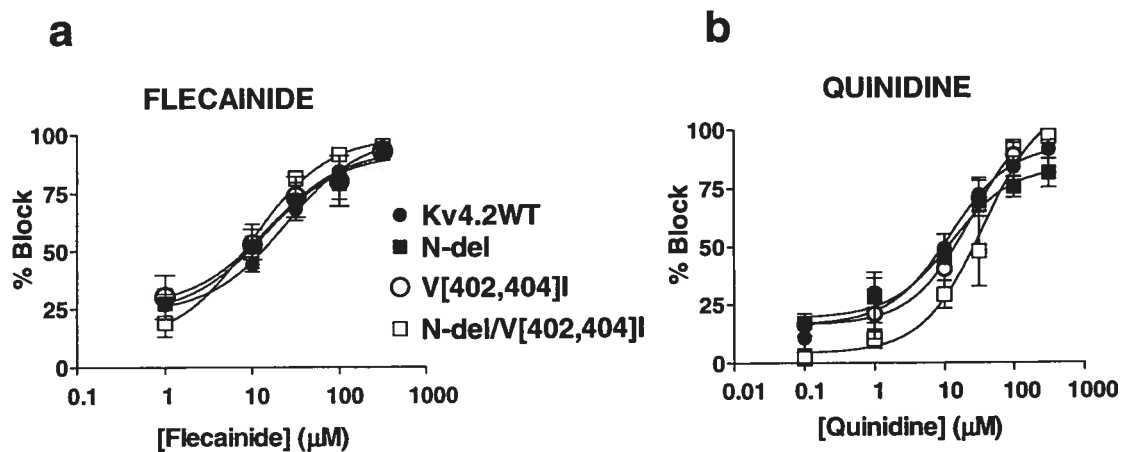
## IX- Figures and figure legends



**Figure 1:** Effects of flecainide on Kv4.2 currents. Currents were elicited by 500 ms pulses from -80 mV to +50 mV in the absence and the presence of flecainide (10  $\mu$ M) in Kv4.2WT (a), N-del (b), V[402,404]I (c) and N-del/V[402,404]I channels (d). (e and f) Inactivation  $\tau_{fast}$  and  $\tau_{slow}$  values (mean  $\pm$  s.e.m. of 5-12 experiments). \* $P < 0.05$  vs control.

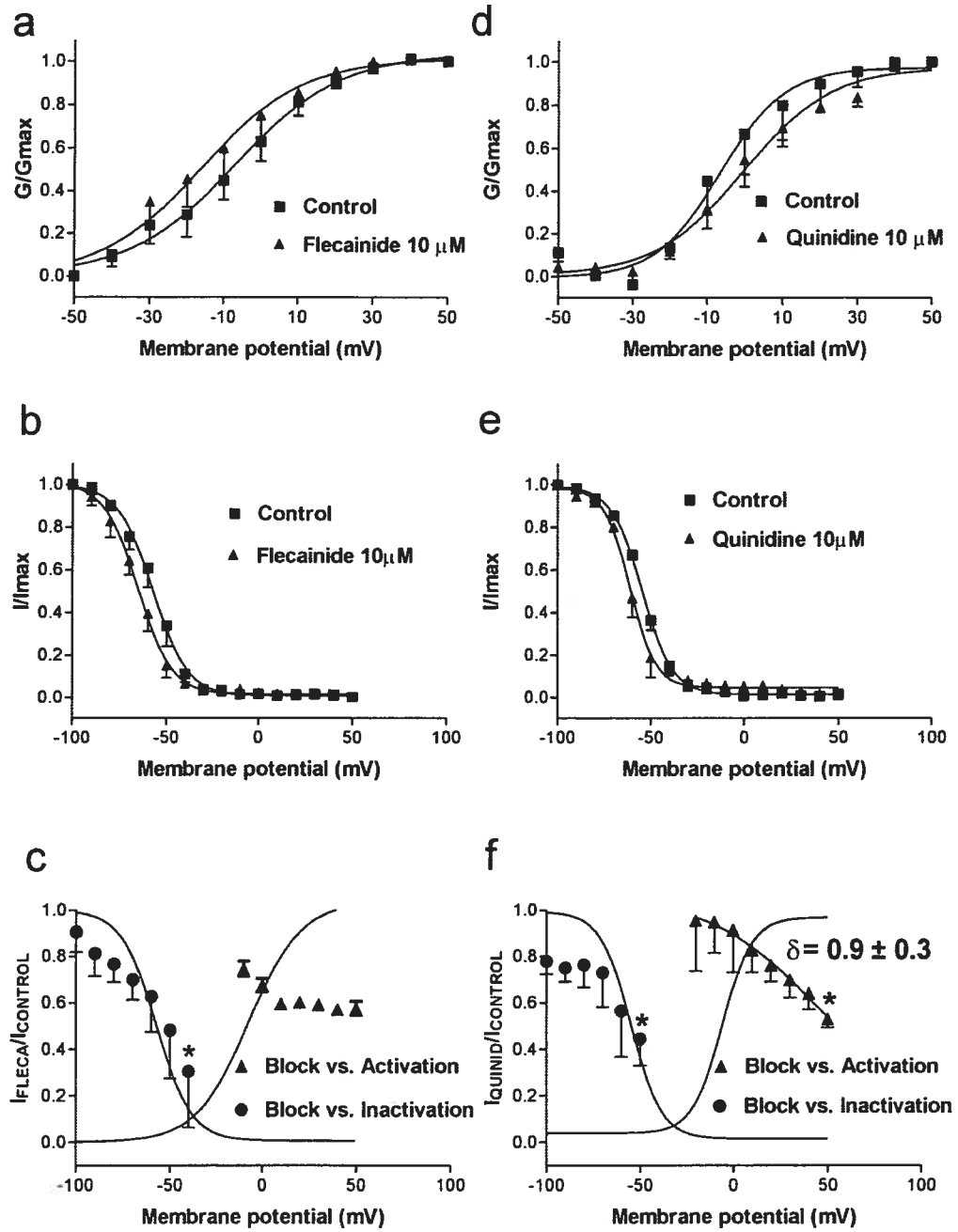


**Figure 2:** Effects of quinidine on Kv4.2 currents. Currents were elicited by 500 ms pulses from -80 mV to +50 mV in the absence and the presence of quinidine (10  $\mu$ M) in Kv4.2WT (a), N-del (b), V[402,404]I (c) and N-del/V[402,404]I channels (d). (e and f) Inactivation  $\tau_{fast}$  and  $\tau_{slow}$  values (mean $\pm$ s.e.m. of seven to nine experiments). \* $P$ <0.05 vs control.



**Figure 3:** Concentration-dependent effects of flecainide and quinidine on Kv4.2 currents upon pulsing to +50 mV. Dose-response curves for flecainide (a) and quinidine (b) were fitted to the Hill equation to obtain the  $IC_{50}$  values in Kv4.2WT, N-del, V[402,404]I and N-del/V[402,404]I channels. Each point represents the mean  $\pm$  s.e.m. of 3-10 experiments.

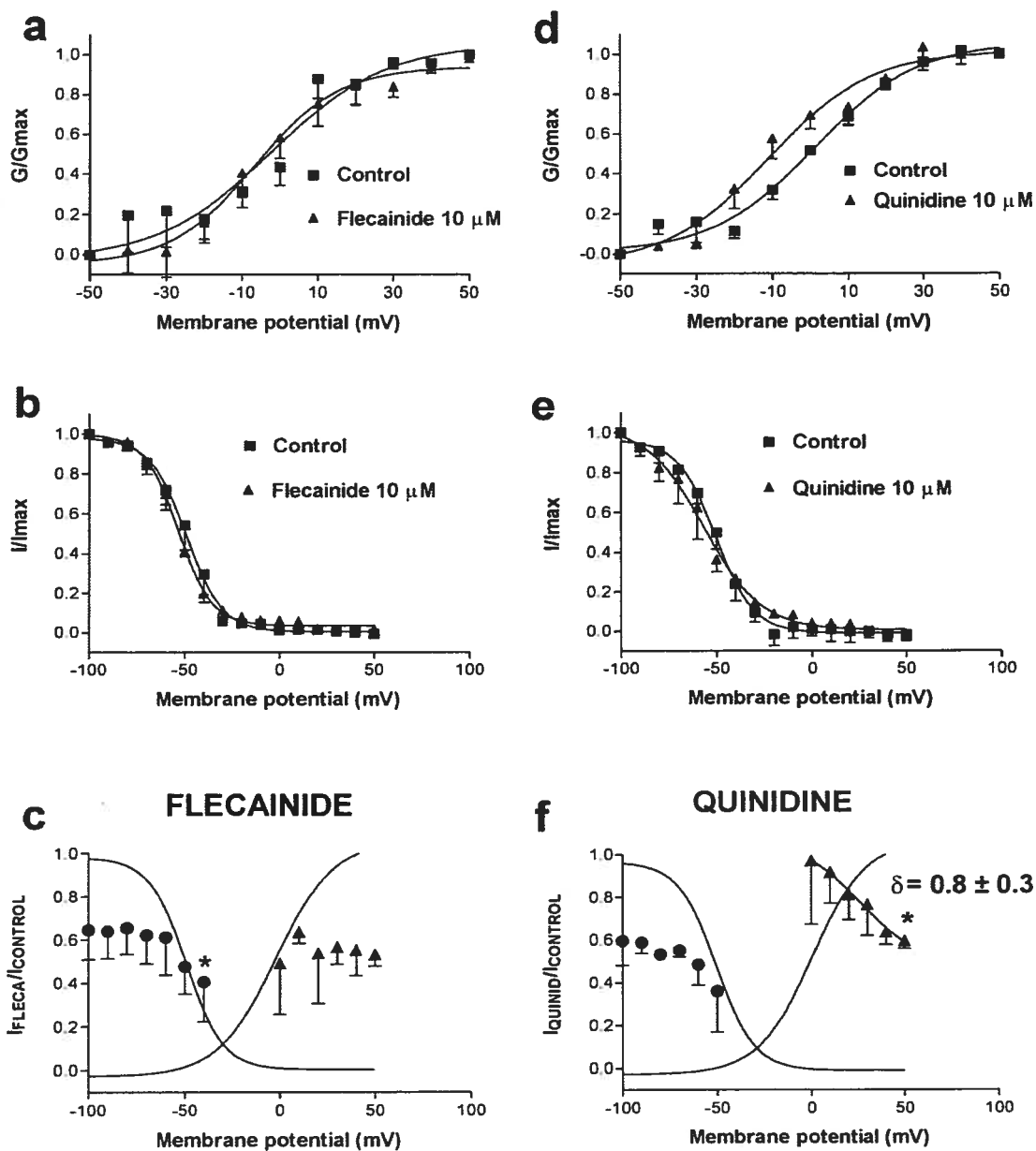
## Kv4.2 WT





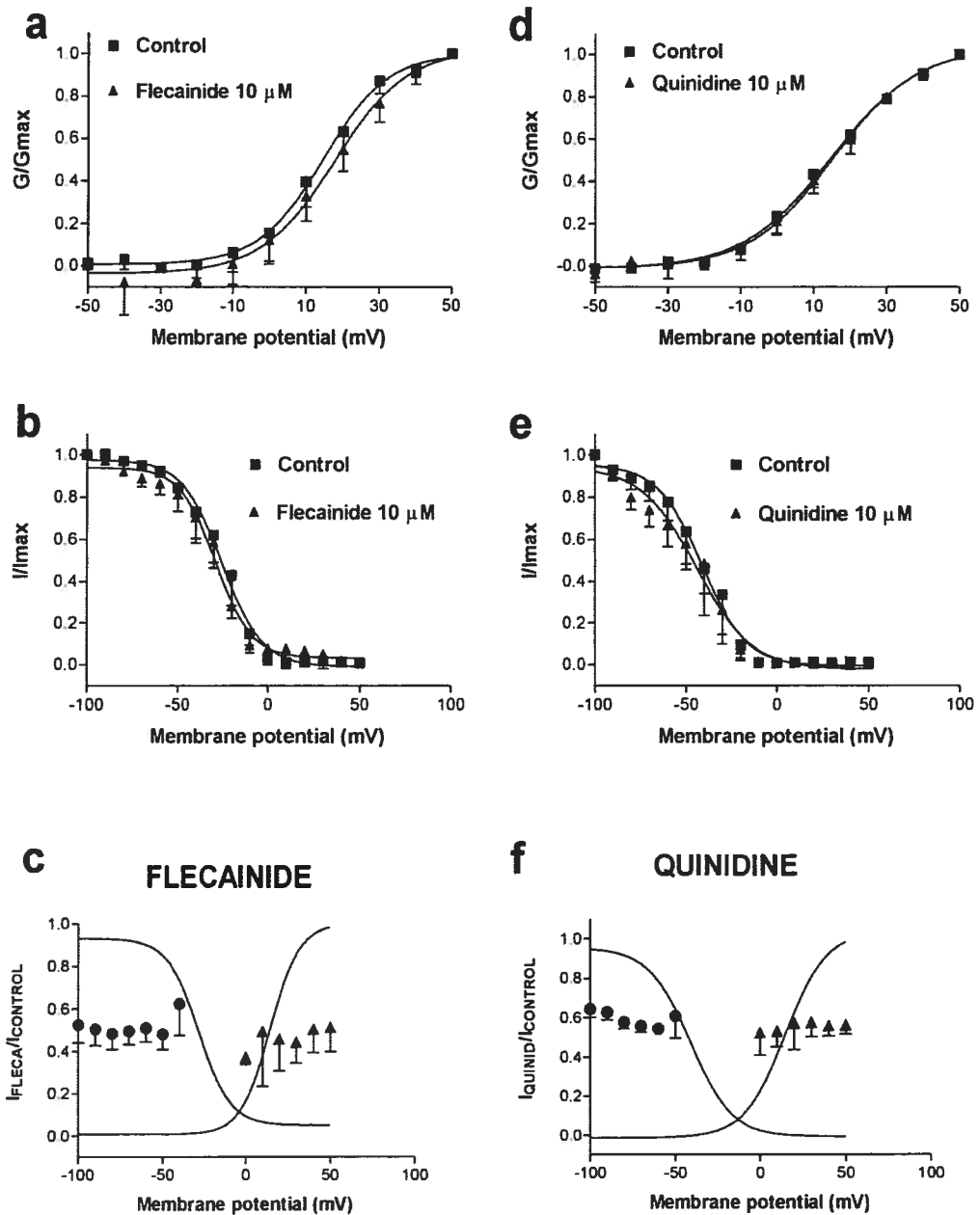
**Figure 4:** Effects of flecainide ( $10 \mu\text{M}$ ) (a-c) and quinidine (d-f) on Kv4.2WT. (a) Effects of flecainide on voltage-dependence of channel activation. Conductance ( $G$ ) was normalized to the maximal conductance ( $G_{\text{max}}$ ) and plotted against membrane potential. (b) Effects of flecainide on the voltage-dependence of channel inactivation. Current amplitude was normalized to the maximum amplitude in each experiment ( $I/I_{\text{max}}$ ) and plotted as a function of the voltage command of the prepulse. (c) Relationships between block and the voltage-dependence of channel inactivation and activation. Circles: flecainide-induced block of currents obtained with pulses to +60 mV after prepulses to potentials ranging -100 and -40 mV as a function of conditioning-pulse voltage.  $*P < 0.05$  vs block after prepulses to -100 mV. Triangles: block of currents elicited with test pulses to voltages from -100 to +50 mV as a function of test-pulse voltage. Curves are best-fit Boltzmann relations to control activation and inactivation curves. Results are mean  $\pm$  s.e. of four experiments. (d) Conductance-voltage and (e) inactivation data obtained in the absence and presence of quinidine. Curves in (a), (b), (d), (e) are best-fit Boltzmann relations. (f) Quinidine-induced blockade related to channel inactivation and activation.  $*P < 0.05$  vs blockade at -100 and -20 mV for inactivation and activation respectively. Curves are Boltzmann fits of control activation and inactivation curves. Results are mean  $\pm$  s.e. from four experiments.

## N-del



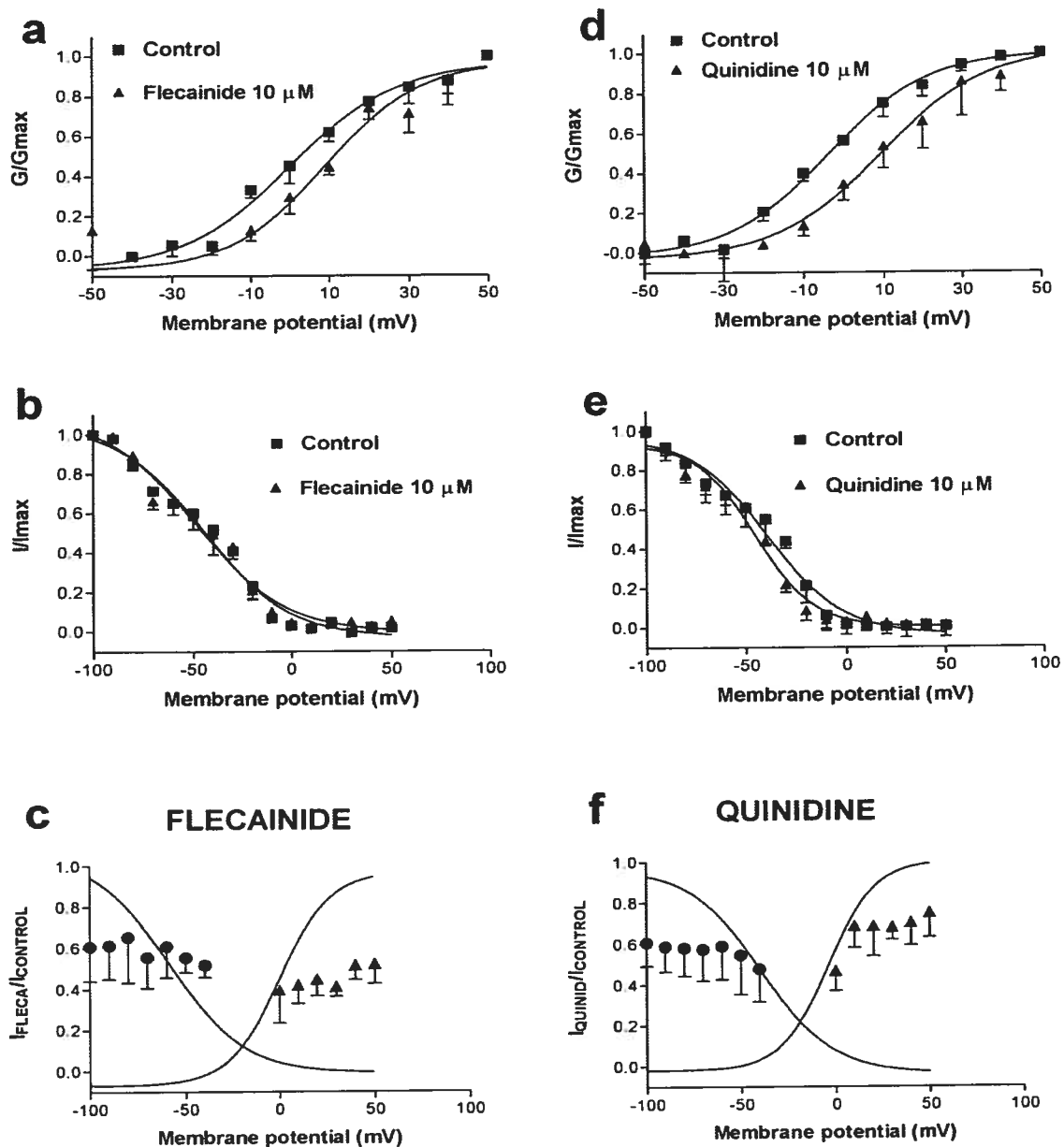
**Figure 5:** Effects of flecainide ( $10 \mu M$ ) and quinidine ( $10 \mu M$ ) on voltage-dependent N-del current activation (a and d) and inactivation (b and e). (c and f) Flecainide- and quinidine-induced blockade related to channel inactivation and activation.  $*P < 0.05$  vs blockade at  $-100$  mV for inactivation and  $0$  mV for activation. Curves in c and f are Boltzmann fits of control activation and inactivation. Results are mean  $\pm$  s.e. of four experiments.

## V[402,404]I



**Figure 6:** Effects of flecainide (10  $\mu$ M) and quinidine (10  $\mu$ M) on voltage-dependent V[402,404]I current activation (a and d) and inactivation (b and e). (c and f) Flecainide- and quinidine-induced blockade related to channel inactivation and activation. The curves are Boltzmann fits of control activation and inactivation curves.

## N-del/V[402-404]I




**Figure 7:** Effects of flecainide (10  $\mu$ M) and quinidine (10  $\mu$ M) on voltage-dependent N-del/V[402,404]I current activation (a and d) and inactivation (b and e). (c and f) Flecainide- and quinidine-induced blockade related to channel inactivation and activation. The curves are Boltzmann fits of control activation and inactivation curves. Results are mean  $\pm$  s.e. of four experiments.

**CHAPITRE III: THE KV4.2 N-TERMINAL  
RESTORES FAST INACTIVATION AND  
CONFERS KCHIP2 MODULATORY EFFECTS TO  
N-TERMINAL DELETED KV1.4 CHANNELS**

Ce manuscrit est sous presse dans la revue *Pflugers Archiv, European Journal of  
Physiology*.

## **The Kv4.2 N-terminal restores fast inactivation and confers KChIP2 modulatory effects to N-terminal deleted Kv1.4 channels**

**Marc Pourrier<sup>1,5</sup>, Daniel Herrera<sup>1,5</sup>, Ricardo Caballero<sup>2,5</sup>, Gernot Schram<sup>3,5</sup>, Zhiguo Wang<sup>3,5</sup>, and Stanley Nattel<sup>3,4,5</sup> **

- (1) Department of Pharmacology, University of Montreal, 2900 Edouard-Montpetit Boulevard, Montreal, Quebec, Canada, H3T 1J4.
- (2) Department of Pharmacology, School of Medicine, Universidad Complutense, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain.
- (3) Department of Medicine, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger Street, Montreal, Quebec, H1T 1C8, Canada
- (4) Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University, McIntyre Medical Sciences Building, 3655 Promenade Sir-William-Osler, Montreal, Quebec, Canada, H3G 1Y6.
- (5) Research Center, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger Street, Montreal, Quebec,  
H1T 1C8, Canada

## **I- Abstract**

The N-terminal end of Kv1.4 subunits is essential for their rapid N-type inactivation, but removal of the entire Kv4.2 N-terminus produces only moderate inactivation slowing. In this study, we investigated the effect of substitution of the Kv4.2 N-terminal for that of Kv1.4 subunits. Despite the small role of the Kv4.2 N-terminal in Kv4.2 inactivation and the limited amino-acid identity between Kv1.4 and Kv4.2 N-terminals, attachment of the Kv4.2 N-terminal to inactivation-deficient N-terminal deleted Kv1.4 subunits restored rapid inactivation. The Kv4.2 N-terminal/N-deleted Kv1.4 chimeric construct had inactivation kinetics like those of Kv4.2, inactivation voltage-dependence resembling Kv1.4 and recovery from inactivation substantially faster than wild-type Kv1.4. Acceleration of reactivation appeared due to the ability of chimeric channels to recover from inactivation without passing through the open state. Co-expression of wild-type Kv1.4 with the K<sup>+</sup>-channel interacting protein KChIP2 did not alter Kv1.4 properties, but co-expression of KChIP2 with Kv4.2 N-terminal/N-deleted Kv1.4 chimeric subunits significantly increased current expression and slowed inactivation, without altering the rate of recovery from inactivation. We conclude that substitution of the Kv4.2 N-terminal for that of Kv1.4 transfers a variety of properties of Kv4.2, including inactivation time-dependence, accelerated recovery from inactivation and interaction with KChIP2, to Kv1.4, indicating the ability of Kv1.4 subunits to display these properties and the sufficiency of the Kv4.2 N-terminal to convey them.

**Keywords:** Potassium channels, inactivation, ionic currents, cardiac electrophysiology, beta subunits, alpha subunits, voltage gated channels

## II- Introduction

The transient outward  $K^+$  current ( $I_{to}$ ) plays an important role in the repolarization of cardiac myocytes [19] and its equivalent A-type current is an important regulator of excitability in neuronal tissue. The first subunit cloned from the heart to carry  $I_{to}$ -like current was Kv1.4, encoding a channel homologous to the *Shaker B* channel of *Drosophila* [31,33]. Subsequently, *Shal* family (Kv4.2 and Kv4.3) channel subunits were shown to play an important role in mammalian cardiac  $I_{to}$  [5,10,26,35].  $I_{to}$  carries a large repolarizing current immediately after the cardiac action potential overshoot that helps to set the plateau level, and its rapid inactivation is crucial in preventing a premature return to the resting potential [26].

The first conceptual model of rapid inactivation of transient outward current was that of a tethered "ball and chain", based on observations in squid giant axons [2]. The molecular basis for the ball and chain in *Shaker B* channels is related to the presence in the amino-terminal of a domain that binds to a receptor site in the pore and occludes the channel [13]. Removal of critical portions of the N-terminal domain of *Shaker B* channels leaves a slower form of inactivation, so-called "C-type inactivation" [13], which appears to involve conformational changes in the external mouth of the pore region [18]. Rapid inactivation of cardiac Kv1.4 channels is similarly abolished by N-terminal deletions [32].

In contrast to Kv1.4 channels, it has been proposed that Kv4.2 channels do not inactivate through typical N- and C-type mechanisms, but have an inactivation mechanism that may involve voltage-associated conformational changes of the internal vestibule in a concerted action involving N- and C-terminal extremities [3,14,15]. Of note, Kv4 channel recovery from inactivation occurs from a closed-inactivated state [3]. This differs from *Shaker* channels, which recover from an open-inactivated state that requires opening before recovery.

The  $\beta$  subunit KChIP2 is expressed in the heart of various species [1,4,8,17,20,21,30] and targeted deletion of KChIP2 strongly suppresses native cardiac  $I_{to}$  in the mouse [17]. KChIPs promote membrane localization and strongly increase  $K^+$  current density resulting from Kv4 subunit expression [1,4]. When co-expressed with Kv4.2 in heterologous systems, KChIP2 slows inactivation,



accelerates recovery from inactivation and shifts the inactivation  $V_{1/2}$  to more positive potentials [4]. KChIP effects seem to be specific for Kv4 subunits, since KChIP1 does not alter the membrane expression of Kv1.4 subunits in *Xenopus* oocytes [1,14,15]. To our knowledge, the functional interaction of KChIP2 with Kv1.4 subunits has not been evaluated, although based on the significant molecular identity between KChIP1 and KChIP2 and the reported lack of effect of KChIP1 on Kv1.4 membrane targeting, one might expect little or no effect.

In preliminary experiments, we observed that, although the Kv4.2 N-terminus is not essential for rapid inactivation of Kv4.2 currents, it is capable of restoring rapid inactivation of currents carried by N-terminal deleted Kv1.4 subunits [24]. The present study was designed to characterize the voltage-dependent and kinetic properties of currents carried by Kv4.2 N-terminal/N-terminal-deleted Kv1.4 chimeric subunits, as well as to study the interaction of KChIP2 with chimeric subunits and to compare this interaction with the interaction of KChIP2 with Kv4.2 subunits.

### **III- materials and methods**

#### **III-1 Preparation of K<sup>+</sup>-channel subunit constructs**

Wild-type rat Kv4.2 (kindly provided by Dr. Jeanne Nerbonne) was cloned into pRc/CMV (Invitrogen, Life Technologies) and wild type Kv1.4 was cloned into pBK/CMV (Invitrogen Life Technologies). The rat KChIP clone used in this study was the 252 amino acid-encoding KChIP2 sequence originally called KChIP2b by takimoto et al [30] (kind gift of Dr D. McKinnon). KChIP2 cDNA was sub-cloned in pCDNA3.1 between EcoRV and Not I sites. Kv4.2 N-terminal ( $\Delta$ 2-151) deletion was performed by polymerase chain reaction (PCR, High Fidelity Kit, Roche). A chimeric sequence was created by fusing the N-terminus of Kv4.2 (1-151) in frame with an N-terminal deleted Kv1.4 ( $\Delta$ 1-283Kv1.4), with the use of overlap extension. Kv4.2 point mutations (V→I) were created by PCR overlap extension with mutagenic oligonucleotide primer pairs (Invitrogen, Life Technologies) with complementary sequences to the desired mutations. The PCR product was then cloned into pTarget

vector (Promega). Fidelity of cDNA synthesis was verified by sequencing (Sheldon Biotechnology Center, McGill University, Quebec, Canada).

### III-2 COS-7 cell maintenance and transfection.

COS-7 cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, GIBCO, Invitrogen Corporation) along with 10 ml/l of a solution containing 100 Units/ml penicillin G-sodium and 100  $\mu\text{g/ml}$  streptomycin-sulfate in 0.85% saline. For cell transfection,  $\sim 2 \times 10^5$  cells were plated onto 35-mm culture dishes. After 24 h at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>, cells reached  $\sim 80\%$  confluence. Approximately 1  $\mu\text{g}$  of sample cDNA ( $\pm 1 \mu\text{g}$  KChIP2b), plus 0.1  $\mu\text{g}$  CD8 cDNA in piXCD8 plasmid, 5.5 ml of Lipofectamine (GIBCO) and 6  $\mu\text{l}$  of Plus reagent were added to DMEM to a final volume of 200  $\mu\text{l}$ . The mixture was added to 800  $\mu\text{l}$  of a cell suspension. After 6-h incubation at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>, 1 ml of 20% FBS was added to provide a final FBS concentration of 10%. Following overnight incubation, the cells were re-plated for 2 additional days in culture. Cells were then washed with 1 x PBS and resuspended in DMEM, along with anti-CD8 beads (Dynabeads M-450, Dynal) to detect successfully-transfected cells.

### III-3 Recording of ionic currents

Whole-cell patch-clamp recordings were performed as previously described in detail [28]. Borosilicate glass electrodes had tip resistances of 2-4 M $\Omega$  when filled with (mM): 0.1 GTP, 110 K-aspartate, 20 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 5 Mg<sup>2+</sup>-ATP, 10 Hepes, 5 EGTA, 5 phosphocreatine (pH 7.3, KOH). Junction potentials between the pipette and bath solution averaged 11.8 $\pm$ 0.9 mV. No voltage compensation for junction potentials was made. The capacitance and series resistance ( $\leq 5\text{M}\Omega$ ) were electronically compensated. Currents were low-pass filtered at 5 kHz and all recordings were performed at 36 $\pm$ 1°C. The bath solution contained (mM): 136 NaCl, 5.4 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 Hepes, 10 glucose, and 1 CaCl<sub>2</sub> (pH 7.4, NaOH). To study the decay of inward current following brief depolarizing pulses, we replaced external Na<sup>+</sup> by K<sup>+</sup> in order to obtain quasi-symmetrical K<sup>+</sup>-concentration conditions (external

[K<sup>+</sup>] ~130 mM). Currents were evoked with 200-ms depolarizing pulses (0.1 Hz) from a holding potential of -80 mV.

### III-4 Data analysis

Group data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical comparisons were performed with Student's *t*-test (for single pairs of data sets). Two-tailed  $P < 0.05$  was taken to indicate a statistically-significant difference. Non-linear least-squares curve-fitting algorithms (Clampfit in pCLAMP 6.0 or Graphpad Prism 3.0) were used for curve-fitting.

## IV- Results

### IV-1 Effects of N-terminal deletion

Deletion of the first 151 amino acids of Kv4.2, ending before the S1 domain, slowed inactivation of the currents resulting from expression of this N-terminal deletion (N-delKv4.2) construct (Fig. 1). In both wild-type (WT) and N-delKv4.2, inactivation was well-fitted by bi-exponential functions (Fig. 1A). Despite modest inactivation slowing in N-delKv4.2, rapid inactivation continued to occur, as previously reported [14]. The time constant of the rapid component of inactivation,  $\tau_{\text{fast}}$ , increased from  $4.3 \pm 0.1$  ms in WT ( $n = 11$ ) to  $12.2 \pm 1.4$  ms (N-del,  $n = 10$ ,  $P < 0.001$ ) at +40mV, whereas the time constant of slow inactivation ( $\tau_{\text{slow}}$ ) was not significantly altered (e.g., at +40 mV:  $44 \pm 4$  ms in WT,  $n = 11$ , versus  $60 \pm 4$  ms for N-delKv4.2,  $n = 10$ ;  $P = \text{NS}$ ). The proportion of slow-phase inactivation was increased from  $10 \pm 1\%$  in WT ( $n = 13$ ) to  $31 \pm 4\%$  (N-del,  $n = 10$ ,  $P < 0.001$ ) at +40 mV.

### IV-2 Effects of valine mutations in the sixth transmembrane segment

To evaluate a Kv4.2 -derived construct with similar inactivation changes to N-delKv4.2, we created a double valine mutant in the sixth transmembrane segment corresponding to mutations in Kv4.1 [15] and Kv4.3 [34] that slow fast inactivation. The double valine-to-isoleucine mutation at positions 402 and 404 (V[402-404]I)

modestly slowed Kv4.2 inactivation (Fig. 1B). The fast component of inactivation was slowed approximately 3-fold (e.g. at +40 mV: from  $4.3 \pm 0.1$  ms in WT ( $n = 11$ ) to  $12.1 \pm 1.9$  ms in V(402-404)I ( $n = 5$ ),  $P < 0.001$ ), a change comparable to the ~3.2-fold slowing observed for N-delKv4.2 (Fig. 1D). V(402-404)I also increased the proportion of slow-phase inactivation (from  $10 \pm 1\%$  in WT ( $n = 13$ ) to  $25 \pm 4\%$  V(402-404)I ( $n = 5$ ),  $P < 0.01$ ) at +40 mV, but the time-constant of slow-phase inactivation was not significantly altered ( $44 \pm 4$  ms in WT ( $n = 11$ ),  $63 \pm 11$  ms in V(402-404)I ( $n = 5$ ),  $P = \text{NS}$ ). To analyze the positional specificity of the S6 valines in Kv4.2 inactivation, we mutated valines 404 and 406 (2 amino acids away from the 402-404 pair) to isoleucine (V[404-406]I). Unlike V(402-404)I, V(404-406)I had no effect on inactivation kinetics (Fig. 1D).

#### **IV-3 N-terminal of Kv4.2 restores fast inactivation to N-terminal-deleted Kv1.4.**

Our results confirmed that, unlike Kv1.4, the N-terminal moiety is not essential for rapid inactivation of Kv4.2. We then posed the question whether, despite the non-essential contribution of the Kv4.2 N-terminal to Kv4.2 inactivation, the Kv4.2 N-terminal could restore inactivation to an inactivation-deficient N-terminal deleted Kv1.4 construct.

Figure 2A shows typical currents from a cell expressing WT Kv1.4, and Figure 2B shows currents from a cell expressing an N-terminal deleted ( $\Delta 2-283$ ) Kv1.4 construct (N-delKv1.4). Current carried by the N-delKv1.4 construct shows negligible inactivation during a 500-ms pulse. Similar results were obtained in three other cells expressing N-delKv1.4, confirming the essential role of the N-terminal moiety in Kv1.4 inactivation. Figure 2C shows currents carried by a chimeric construct containing the 151-amino acid N-terminal end of Kv4.2 (corresponding to the portion removed to create N-delKv4.2) attached to the N-terminal of the same N-delKv1.4 construct used to obtain the currents in Fig. 2B. The chimeric construct clearly shows rapid inactivation. These results indicate that the N-terminal of Kv4.2, although not essential for Kv4.2 rapid inactivation, restores rapid inactivation to an N-terminal deleted Kv1.4. In fact, the inactivation of chimeric channels was even

more rapid than that of WTKv1.4, as indicated by the recordings upon depolarization to +40 mV shown on an enlarged time scale in Fig. 2D, E. The time constants of chimeric current inactivation were comparable to those of Kv4.2 (Figs 2F, G), and its fast-phase inactivation was significantly more rapid than that of Kv1.4 (Fig. 2D). The proportion of inactivation in the rapid phase was  $71\pm 4\%$  ( $n=7$  cells) for the chimera, comparable to the value ( $83\pm 2\%$ ,  $n=11$  cells) for Kv1.4 but significantly less than the value ( $91\pm 1\%$ ,  $n=11$  cells,  $P<0.01$ ) for Kv4.2.

Figure 3 shows an analysis of the voltage-dependent inactivation properties of Kv4.2, Kv1.4 and chimeric channels. We used 900-ms prepulses to various potentials to induce varying degrees of inactivation, followed by a test pulse to +60 mV. Kv4.2 showed measurable inactivation following a pulse to -50 mV and the majority of the current was inactivated upon pulsing to -40 mV, as illustrated by the representative recordings from one cell shown in Figure 3A. In contrast, Kv1.4 required pulsing to more positive voltages to induce inactivation, with a prepulse to -40 mV inactivating a minority of the current (Figure 3B). Chimeric channels showed inactivation voltage-dependence resembling that of Kv1.4, with substantial current still available at -40 mV (Fig. 3C). Overall mean data are shown in Figure 3D, and indicate that, unlike inactivation kinetics, the voltage-dependent inactivation properties of the chimera resemble those of Kv1.4 rather than Kv4.2. Half-inactivation voltages calculated for each cell averaged  $-54.2\pm 2.0$  mV ( $n=4$  cells) for the chimera, versus  $-51.1\pm 1.4$  mV ( $n=5$  cells,  $P=NS$ ) for Kv1.4 and  $-63.7\pm 2.3$  mV ( $n=8$  cells) for Kv4.2 ( $P<0.05$  versus chimera).

An analysis of reactivation properties is shown in Figure 4. Figure 4A shows rapid recovery from inactivation in one cell expressing Kv4.2, as tested with a paired-pulse protocol. In contrast, Kv1.4 reactivation was much slower (Fig. 4B), occurring over a time frame of seconds rather than hundreds of milliseconds as was the case for Kv4.2. The chimera showed reactivation properties (Fig. 4C) that were clearly faster than those of Kv1.4, albeit somewhat slower than those of Kv4.2. Mean data (Figure 4D) confirm the much more rapid recovery of chimeric channels compared to Kv1.4. Single exponential fits to mean data are shown. Overall, the recovery time constant for chimeric channels at -80 mV averaged  $367\pm 71$ ms ( $n=6$  cells), compared to

1424±212 ms ( $n=5$  cells,  $P<0.001$  versus chimera) for WT Kv1.4 and 122±3 ms ( $n=5$  cells,  $P<0.05$  versus chimera) for WT Kv4.2.

We were somewhat surprised by the effect of Kv4.2 N-terminal substitution on the reactivation of Kv1.4, given the classical observations of Rasmusson et al [25], which suggested that C-terminal properties determine the recovery of Kv1.4. To gain further insight into this observation, we adopted an approach used by Gebauer et al to demonstrate open-channel unblocking in Kv4.2. Figure 5 shows Kv1.4 (Fig 5A), Kv4.2 (Fig 5B) and chimera (Fig5C) inward currents (in the presence of 130 mM external  $[K^+]$  at room temperature) after 5 or 65 ms depolarizing pulses to +50 mV. The top panels show illustrative original recordings. Inward current decay is relatively slow for Kv1.4, reflecting a requirement to unblock the inactivation particle before returning to the closed state. For Kv1.4, current decay is fast for the shorter pulse, but with the longer activating pulse a relatively large slowly-decaying component is seen, believed to reflect N-terminal inactivation and a need to release the inactivation particle in order to close [12]. In comparison with Kv4.2, the chimera shows a larger rapidly-decaying component at 65 ms, reflecting its slower recovery. However, compared to Kv1.4, the chimera displays much faster initial decay, more like that of Kv4.2, with a distinct slowly-decaying component that is particularly clear for the 65-ms pulse.

Mean inward-current decay time constants are shown in Fig. 5D, E. Consistent with the ability of Kv4.2 to close rapidly without transiting through the open state, the decay time constants are faster for Kv4.2 than for Kv1.4. In agreement with the results previously obtained by Gebauer et al [12], the proportion of slow-phase decay of Kv4.2 increases significantly for the 65-ms pulse, from 5±3% (for the 5 ms pulse) to 24±5% of overall decay, and the time constants of Kv4.2 approach those of Kv1.4. The behaviour of the chimera resembles that of Kv4.2, suggesting that the Kv4.2 N-terminal allows the chimera to close without having to unblock from the inactivation particle and potentially accounting for its faster recovery compared to Kv1.4. The slowly-decaying portion is particularly large at 65 ms for the chimera (47±12% of overall), providing a possible explanation for the fact that chimera recovery remains slower than that of Kv4.2.

#### IV-4 Effect of KChIP2 on Kv4.2.

The effects of KChIP2 co-transfection on Kv4.2 currents are shown in Figure 6. Figure 6A shows representative currents recorded upon expression of Kv4.2 alone (left) and of Kv4.2 co-expressed with KChIP2 (right). Consistent with previous observations [1], Kv4.2 current density was strongly enhanced by co-expression with KChIP2 (Fig. 6B). Co-expression with KChIP2 slowed Kv4.2 fast-phase inactivation (Fig. 6C). Slow-phase Kv4.2 inactivation was unaffected by KChIP2 (Fig. 6D). The relative contribution of fast-phase inactivation ( $A_{\text{fast}}$ ) was also decreased by co-expression with KChIP2 (Kv4.2 alone,  $A_{\text{fast}} = 91 \pm 1\%$  of total,  $n=11$  cells, compared to  $A_{\text{fast}} = 83 \pm 3\%$ ,  $n=6$  cells,  $P < 0.05$  for Kv4.2+KChIP2). KChIP2 shifted the voltage dependence of Kv4.2 inactivation to more positive potentials (Fig. 6E). The half-inactivation voltage averaged  $-64 \pm 2$  mV ( $n=8$  cells) for Kv4.2 alone and  $-48.4 \pm 4.5$  mV ( $n=3$ ,  $P < 0.01$ ) for Kv4.2+KChIP2. Finally, KChIP2 dramatically accelerated Kv4.2 recovery kinetics (Fig. 6F), with the recovery time constant at  $-80$  mV averaging  $122 \pm 3$  ms ( $n=5$  cells) for Kv4.2 alone compared with  $9.8 \pm 1.9$  ms ( $n=5$  cells,  $P < 0.001$ ) for Kv4.2+KChIP2.

It has been suggested that the inner pore structure is an important factor in the modulatory effects of the 270 amino acid KChIP2 isoform on Kv4.3 channels [34]. As shown in Figure 7, the interaction of the shorter KChIP2 isoform used in the present study with Kv4.2 was somewhat altered by the double-valine mutation. The double-valine mutant did not alter the current-density enhancing effect of KChIP2 (Figs 7A, B). However, in contrast to Kv4.2, for which only fast-phase inactivation was slowed by co-expression with KChIP2 (Figs 6C, D) both phases were slowed for the double-valine mutant (Figs 7C, D). The relative contribution of fast and slow phases to overall inactivation was not significantly changed by co-expression with KChIP2: for V(402-404)I alone,  $A_{\text{fast}}$  was  $75 \pm 4\%$  of total ( $n=5$  cells), compared to  $85 \pm 2\%$  ( $n=6$  cells,  $P = \text{NS}$ ) for V(402-404)I co-expressed with KChIP2. The depolarizing shift in inactivation voltage-dependence and the recovery slowing effect of KChIP2 were not altered by the double valine mutation in Kv4.2 (Figs 7E, F).

#### **IV-5 Results of KChIP2 co-expression with Kv1.4.**

Figure 8A shows recordings of currents resulting from Kv1.4 expression, with and without KChIP2 co-expression, in COS-7 cells. No KChIP2 effects on current density (Fig. 8B), inactivation kinetics (Figs 8C, D), inactivation voltage dependence (Fig. 8E), or kinetics of recovery from inactivation (Fig. 8F) could be detected.

#### **IV-6 KChIP2 effects on the N-termKv4.2/N-delKv1.4 chimeric protein.**

Figure 9A shows the effect of KChIP2 on currents recorded upon depolarization to +40 mV in COS-7 cells transfected with the chimeric construct alone (left) and with the chimeric construct and KChIP2 (right). The size of chimeric currents was increased and their inactivation was slowed by KChIP2 co-expression. Overall, average current density was increased about 5-fold by co-expression with KChIP2 (Fig. 9B), a change of the same order as that produced for the Kv4.2 constructs (Figs 6B and 7B). Co-expression with KChIP2 slowed both fast (Fig. 9C) and slow (Fig. 9D) phases of chimeric current inactivation. However, KChIP2 did not alter the voltage dependence of chimeric current inactivation (Fig. 9E), nor did it affect recovery kinetics (Fig. 9F).

Table 1 shows a comparison of the effects of KChIP2 on mean current density at +50 mV for the various constructs studied. In the absence of KChIP2, the density was of the order of ~100 pA/pF for Kv4.2 and the double valine mutant of Kv4.2, and was about 3-4 fold larger for Kv1.4. The substitution of the Kv4.2 N-terminal for that of Kv1.4 resulted in substantially decreased current density compared to wild type Kv1.4. Co-expression with KChIP2 increased the density of the Kv4.2-based constructs by ~4-fold and produced a comparable ~5-fold increase in density of the chimeric construct, but had no effect on Kv1.4 current density.

### **V- Discussion**

In the present work, we note the ability of the Kv4.2 N-terminus to restore inactivation to an inactivation-deficient N-terminal deletion construct of Kv1.4, and



assess the interaction of the K<sup>+</sup>-channel interacting peptide KChIP2 with Kv1.4 in the absence and presence of the Kv4.2 N-terminal substitution, as well as with wild-type Kv4.2 and a double-valine terminal S6-mutated Kv4.2. The principal novel findings of our study are that: 1) despite low sequence homology with the N-terminal of Kv1.4 and an apparently minor role in Kv4.2 inactivation, the Kv4.2 N-terminal can restore rapid inactivation to N-terminal deleted Kv1.4; 2) replacement of the Kv1.4 N-terminus by that of Kv4.2 accelerates Kv1.4 reactivation; and 3) although Kv1.4 itself does not interact with KChIP2, the Kv4.2 N-terminal /N-terminal deleted Kv1.4 chimeric construct shows significant interactions with KChIP2 at the level of both increased current expression and slowed inactivation.

### **V-1 Role of N-terminal in Kv4.2 and Kv1.4 inactivation**

The inactivation of Kv4 channels is thought to be the result of complex interactions between different parts of the channel [14]. Unlike *Shaker* channels, which require passage through the open state to recover from inactivation [9,27], Kv4 channels appear to recover from a closed-inactivated state [3,15]. Removal of the N-terminal domain eliminates rapid, so-called “N-type” inactivation in *Shaker* [13] and Kv1.4 [16,32] channels, but produces more modest effects in Kv4.1 [14,15] and Kv4.2 [3] channels. In the present study and in previous work [7] we similarly noted that deletion of the entire N-terminal domain of Kv4.2 produces modest inactivation slowing but certainly does not eliminate rapid inactivation.

This evidence has been interpreted as suggesting that rapid inactivation of Kv4 channels is not due to an N-type mechanism [15], a notion that fits with the low sequence homology between Kv1.4 and Kv4 channels (e.g. 24% amino acid identity between rat Kv1.4 and Kv4.2). We therefore were surprised by the fact that the Kv4.2 N-terminal was capable of restoring rapid inactivation to N-terminal deletion, rapid-inactivation deficient Kv1.4 channels. In fact, the inactivation kinetics of Kv4.2 N-terminal/N-terminal-deleted Kv1.4 chimeric channels resembled those of Kv4.2 and were significantly faster than those of wild type Kv1.4 (Fig. 2). However, this finding is quite consistent with a very elegant series of experiments recently reported by Gebauer et al [12]. These authors demonstrated evidence for a component of open-

inactivation transition typical of N-type inactivation in Kv4.2, which was abolished by N-terminal truncation. Furthermore, inactivation was accelerated in N-terminal truncated Kv4.2 by the Kv4.2 N-terminal peptide. Substitution of the Kv4.2 N-terminal for that of Kv2.1 and Kv1.5 N-terminals produced rapid inactivation, whereas wild type Kv2.1 and Kv1.5 lack a rapid inactivation mechanism. Gebauer et al concluded that Kv4.2 channels do in fact demonstrate N-type inactivation, which is normally masked by other rapid inactivation mechanisms with prominent closed-state inactivation, but which can be unmasked by appropriate experimental analysis and can produce rapid inactivation in subunits normally lacking it. The molecular basis of the ability of the Kv4.2 N-terminal to produce rapid inactivation remains an interesting and unresolved issue, particularly in view of the low sequence homology between the Kv4.2 N-terminal and that of Kv1.4. The fact that the inactivation voltage dependence of Kv4.2 N-terminal/ N-terminal-deleted Kv1.4 chimeric channels resembles that of Kv1.4 rather than Kv4.2 (Fig. 3) suggests that Kv1.4 inactivation voltage-dependence is determined by interactions with a voltage sensor outside the N-terminal region, for which the most likely candidate would be the S4 voltage sensing region [6].

### **V-2 Reactivation properties of Kv4.2 and Kv1.4**

Discrete time-dependent recovery from inactivation is a characteristic feature of transient outward currents, with cardiac  $I_{to}$  corresponding to Kv4 subunits, such as the human current, recovering much more rapidly than those with a significant Kv1.4 component, such as the rabbit [11,35]. Kv1.4 recovery is dominated by the C-type inactivation mechanism, with reactivation in N-terminal deleted Kv1.4 occurring at the same rate as for wild-type Kv1.4, both under physiological conditions and in response to a variety of perturbations altering reactivation kinetics [25]. The slow recovery from C-type inactivation may be related to the requirement for release of the inactivation ball to allow entry into the open state prior to recovery from inactivation, as shown in Shaker channels [9,27]. The more rapid recovery of Kv4.2 channels appears to be due to their tendency to accumulate in a closed-inactivated state upon

depolarization, from which they can recover without having to transit through the open state [3].

We found that replacement of the Kv1.4 N-terminal with that of Kv4.2 resulted in recovery from inactivation that was substantially faster than that of wild type Kv1.4 (Fig. 4). This observation indicates that restoration of fast inactivation in N-deleted Kv1.4 by addition of the Kv4.2 N-terminal does not simply restore Kv1.4 inactivation properties, which are dominated by slow recovery from inactivation of the C-terminal type, but confers more rapid reactivation properties determined by molecular motifs in the Kv4.2 N-terminal. This notion is also consistent with the fact that chimeric channels inactivate at a rate typical for Kv4.2 and faster than that of Kv1.4 (Fig. 2). Rasmusson et al have shown that removal of the Kv1.4 N-terminal does not affect the reactivation rate [25], suggesting that the primary molecular determinants for Kv1.4 recovery are in the C-terminal. Here, we show that the Kv4.2 N-terminal confers properties to Kv1.4 that allow it to recover much more rapidly, apparently by reducing the requirement for passage through the open state prior to closure (Figure 5). Additional detailed analyses to explore the molecular basis of the inactivation and reactivation kinetics of the Kv4.2 N-terminal/Kv1.4 N-terminal deleted chimera would be very interesting, and might provide novel insights into interactions between N-terminal molecular motifs and other regions of the channel involved in inactivation, but go beyond the scope of the present manuscript.

### V-3 Interactions with KChIP2

The discovery of KChIP subunits [1] was a significant advance in our understanding of the regulation of the expression and biophysical properties of Kv4-based  $K^+$  channels. The various KChIP isoforms detected to date have a variety of effects on Kv4 currents (for review, see ref. [23]), but the characteristic responses to KChIP co-expression include increased current density, slowed development of, and accelerated recovery from, voltage-dependent inactivation. Targeted deletion of KChIP2 leads to loss of  $I_{to}$ , delayed repolarization and a ventricular tachycardia phenotype in mice [17]. Several studies have shown an important role for KChIPs in membrane trafficking of Kv4  $\alpha$ -subunits [4,20,29]. Bähring et al showed that the

proximal N-terminal Kv4 domain is essential for the kinetic and membrane-targeting properties of KChIP2 [4]. Enhanced membrane expression of Kv4 subunits resulting from KChIPs results from a release of endoplasmic reticulum retention [29] and is mimicked by removing the proximal Kv4.2 N-terminal, suggesting the presence of an N-terminal endoplasmic reticulum retention motif that is bound and inactivated by KChIPs [4].

We found that KChIP2 fails to alter the inactivation kinetics, voltage-dependence or density of currents resulting from Kv1.4 expression in COS-7 cells, consistent with the previously reported lack of effect of KChIP1 on surface expression of Kv1.4 [1]. However, substitution of the Kv4.2 N-terminal for that of Kv1.4 induces significant interactions with KChIP2. Interestingly, the current density resulting from Kv1.4 expression is substantially greater than that of Kv4.2 (Table 1), consistent with the notion of a specific endoplasmic reticulum retention signal in the Kv4 N-terminal responsible for the KChIP2 membrane-targeting interaction [4] that is lacking in Kv1.4. This interpretation is also consistent with the dramatic decrease in Kv1.4 current density that results when the Kv4.2 N-terminus is substituted for that of Kv1.4 (Table 1) and the significant increase in chimeric current density resulting from KChIP2 co-expression. Our observation that KChIP2 slows inactivation of Kv4.2 N-terminus/Kv1.4 N-deleted chimeric subunit currents is consistent with the important role of Kv4.2 N-terminal motifs in the KChIP kinetic interaction [12]. Interestingly, we found that despite inactivation slowing by KChIP2, the rate of recovery from inactivation was unaltered. This observation is consistent with the identification by Patel et al [22] of different molecular regions responsible for KChIP2 effects on inactivation rate (the EF hand in a minimal-length KChIP2 isoform) and reactivation (outside the EF hand). The Kv4.2 N-terminal/N-deleted Kv1.4 chimera might prove useful for future studies of the molecular determinants of the kinetic effects of KChIPs.

Although the double-valine Kv4.2 mutant produced inactivation slowing in Kv4.2 similar to that caused by N-terminal deletion (Fig. 1), its effects on the KChIP2 interaction (Fig. 7) were much more subtle than the loss of interaction previously reported for Kv4.2 N-terminal deletions [4]. The primary effect of the double-valine mutation was to enhance the inactivation-slowing effect of KChIP2, in part by

extending it to slow-phase inactivation, which was unaffected by KChIP2 for wild type Kv4.2. Wang et al [34] similarly observed increased inactivation slowing by KChIP2 when expressed with a homologous double-valine mutant of Kv4.3, consistent with a role for interactions with the inner pore region in kinetic effects of KChIP2.

## **VI- Acknowledgements.**

The authors thank the Canadian Institutes for Health Research and the Quebec Heart Foundation for financial support and the Canadian Heart Foundation for studentship support of Marc Pourrier. They also thank Chantal St-Cyr and Evelyn Landry for technical help, as well as Luce Bégin for secretarial help with the manuscript.

## VII- References

1. An, W. F., Bowlby, M. R., Betty, M., Cao, J., Ling, H. P., Mendoza, G., Hinson, J. W., Mattsson, K. I., Strassle, B. W., Trimmer, J. S., and Rhodes, K. J. (2000). Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature* 403: 553-556
2. Armstrong, C. M. (1971). Interaction of tetraethylammonium ion derivatives with the potassium channels of giant axons. *J Gen.Physiol* 58: 413-437
3. Bähring, R., Boland, L. M., Varghese, A., Gebauer, M., and Pongs, O. (2001). Kinetic analysis of open- and closed-state inactivation transitions in human Kv4.2 A-type potassium channels. *J Physiol* 535: 65-81
4. Bähring, R., Dannenberg, J., Peters, H. C., Leicher, T., Pongs, O., and Isbrandt, D. (2001). Conserved Kv4 N-terminal domain critical for effects of Kv channel-interacting protein 2.2 on channel expression and gating. *J Biol.Chem.* 276: 23888-23894
5. Barry, D. M., Xu, H., Schuessler, R. B., and Nerbonne, J. M. (1998). Functional knockout of the transient outward current, long-QT syndrome, and cardiac remodeling in mice expressing a dominant-negative Kv4 alpha subunit. *Circ.Res.* 83: 560-567
6. Bezanilla, F. (2000). The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol Rev.* 80: 555-592
7. Caballero, R., Pourrier, M., Schram, G., Delpon, E., Tamargo, J., and Nattel, S. (2003). Effects of flecainide and quinidine on Kv4.2 currents: voltage dependence and role of S6 valines. *Br.J.Pharmacol.* 138: 1475-1484
8. Decher, N., Uyguner, O., Scherer, C. R., Karaman, B., Yuksel-Apak, M., Busch, A. E., Steinmeyer, K., and Wollnik, B. (2001). hKChIP2 is a functional modifier of hKv4.3 potassium channels: cloning and expression of a short hKChIP2 splice variant. *Cardiovasc.Res.* 52: 255-264
9. Demo, S. D. and Yellen, G. (1991). The inactivation gate of the Shaker K<sup>+</sup> channel behaves like an open-channel blocker. *Neuron* 7: 743-753
10. Dixon, J. E., Shi, W., Wang, H. S., McDonald, C., Yu, H., Wymore, R. S., Cohen, I. S., and McKinnon, D. (1996). Role of the Kv4.3 K<sup>+</sup> channel in ventricular muscle. A molecular correlate for the transient outward current [published erratum appears in *Circ Res* 1997 Jan;80(1):147]. *Circ.Res.* 79: 659-668

11. Fermini, B., Wang, Z., Duan, D., and Nattel, S. (1992). Differences in rate dependence of transient outward current in rabbit and human atrium. *Am J Physiol* 263: H1747-H1754
12. Gebauer, M., Isbrandt, D., Sauter, K., Callsen, B., Nolting, A., Pongs, O., and Bähring, R. (2004). N-type Inactivation Features of Kv4.2 Channel Gating. *Biophys J* 86: 210-223
13. Hoshi, T., Zagotta, W. N., and Aldrich, R. W. (1990). Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science* 250: 533-538
14. Jerng, H. H. and Covarrubias, M. (1997). K<sup>+</sup> channel inactivation mediated by the concerted action of the cytoplasmic N- and C-terminal domains. *Biophys.J* 72: 163-174
15. Jerng, H. H., Shahidullah, M., and Covarrubias, M. (1999). Inactivation gating of Kv4 potassium channels: molecular interactions involving the inner vestibule of the pore. *J Gen.Physiol* 113: 641-660
16. Kondoh, SI, Ishii, K, Nakamura, Y, and Taira, N (1997). A mammalian transient type K<sup>+</sup> channel, rat Kv1.4, has two potential domains that could produce rapid inactivation. *J Biol.Chem.* 272: 19333-19338
17. Kuo, H. C., Cheng, C. F., Clark, R. B., Lin, J. J., Lin, J. L., Hoshijima, M., Nguyen-Tran, V. T., Gu, Y., Ikeda, Y., Chu, P. H., Ross, J., Giles, W. R., and Chien, K. R. (2001). A defect in the Kv channel-interacting protein 2 (KCHIP2) gene leads to a complete loss of I(to) and confers susceptibility to ventricular tachycardia. *Cell* 107: 801-813
18. Liu, Y., Jurman, M. E., and Yellen, G. (1996). Dynamic rearrangement of the outer mouth of a K<sup>+</sup> channel during gating. *Neuron* 16: 859-867
19. Nerbonne, J. M. (2000). Molecular basis of functional voltage-gated K<sup>+</sup> channel diversity in the mammalian myocardium. *J.Physiol* 525 Pt 2: 285-298
20. Ohya, S., Morohashi, Y., Muraki, K., Tomita, T., Watanabe, M., Iwatsubo, T., and Imaizumi, Y. (2001). Molecular cloning and expression of the novel splice variants of K(+) channel-interacting protein 2. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 282: 96-102
21. Patel, S. P., Campbell, D. L., Morales, M. J., and Strauss, H. C. (2002). Heterogeneous expression of KCHIP2 isoforms in the furet heart. *J.Physiol* 539: 649-656
22. Patel, S. P., Campbell, D. L., and Strauss, H. C. (2002). Elucidating KCHIP effects on Kv4.3 inactivation and recovery kinetics with a minimal KCHIP2 isoform. *J.Physiol* 545: 5-11

23. Pourrier, M., Schram, G., and Nattel, S. (2003). Properties, expression and potential roles of cardiac K<sup>+</sup> channel accessory subunits: MinK, MiRPs, KChIP, and KChAP. *J.Membr.Biol.* 194: 141-152
24. Pourrier, M., Schram, G., Wang, Z. G., and Nattel, S. (2000). Molecular basis of rapid inactivation of cardiac transient outward potassium currents. *Circulation* 102: II-23 (Abstract).
25. Rasmusson, R. L., Morales, M. J., Castellino, R. C., Zhang, Y., Campbell, D. L., and Strauss, H. C. (1995). C-type inactivation controls recovery in a fast inactivating cardiac K<sup>+</sup> channel (Kv1.4) expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol (Lond)* 489 ( Pt 3): 709-721
26. Rasmusson, R. L., Morales, M. J., Wang, S., Liu, S., Campbell, D. L., Brahmajothi, M. V., and Strauss, H. C. (1998). Inactivation of voltage-gated cardiac K<sup>+</sup> channels. *Circ.Res.* 82: 739-750
27. Ruppersberg, J. P., Frank, R., Pongs, O., and Stocker, M. (1991). Cloned neuronal IK(A) channels reopen during recovery from inactivation. *Nature* 353: 657-660
28. Shi, H., Wang, H., Lu, Y., Yang, B., and Wang, Z. (1999). Choline modulates cardiac membrane repolarization by activating an M3 muscarinic receptor and its coupled K<sup>+</sup> channel. *J Membr.Biol.* 169: 55-64
29. Shibata, R., Misonou, H., Campomanes, C. R., Anderson, A. E., Schrader, L. A., Doliveira, L. C., Carroll, K. I., Sweatt, J. D., Rhodes, K. J., and Trimmer, J. S. (2003). A fundamental role for KChIPs in determining the molecular properties and trafficking of Kv4.2 potassium channels. *J Biol.Chem.* 278: 36445-36454
30. Takimoto, K., Yangi, E. K., and Conforti, L. (2002). Palmitoylation of KChIP splicing variants is required for efficient cell surface expression of Kv4.3 channels. *J.Biol.Chem.* 277: 26904-26911
31. Tamkun, M. M., Knoth, K. M., Walbridge, J. A., Kroemer, H., Roden, D. M., and Glover, D. M. (1991). Molecular cloning and characterization of two voltage-gated K<sup>+</sup> channel cDNAs from human ventricle. *FASEB J* 5: 331-337
32. Tseng-Crank, J., Yao, J. A., Berman, M. F., and Tseng, G. N. (1993). Functional role of the NH<sub>2</sub>-terminal cytoplasmic domain of a mammalian A-type K channel. *J.Gen.Physiol* 102: 1057-1083
33. Tseng-Crank, J. C., Tseng, G. N., Schwartz, A., and Tanouye, M. A. (1990). Molecular cloning and functional expression of a potassium channel cDNA isolated from a rat cardiac library. *FEBS Lett.* 268: 63-68



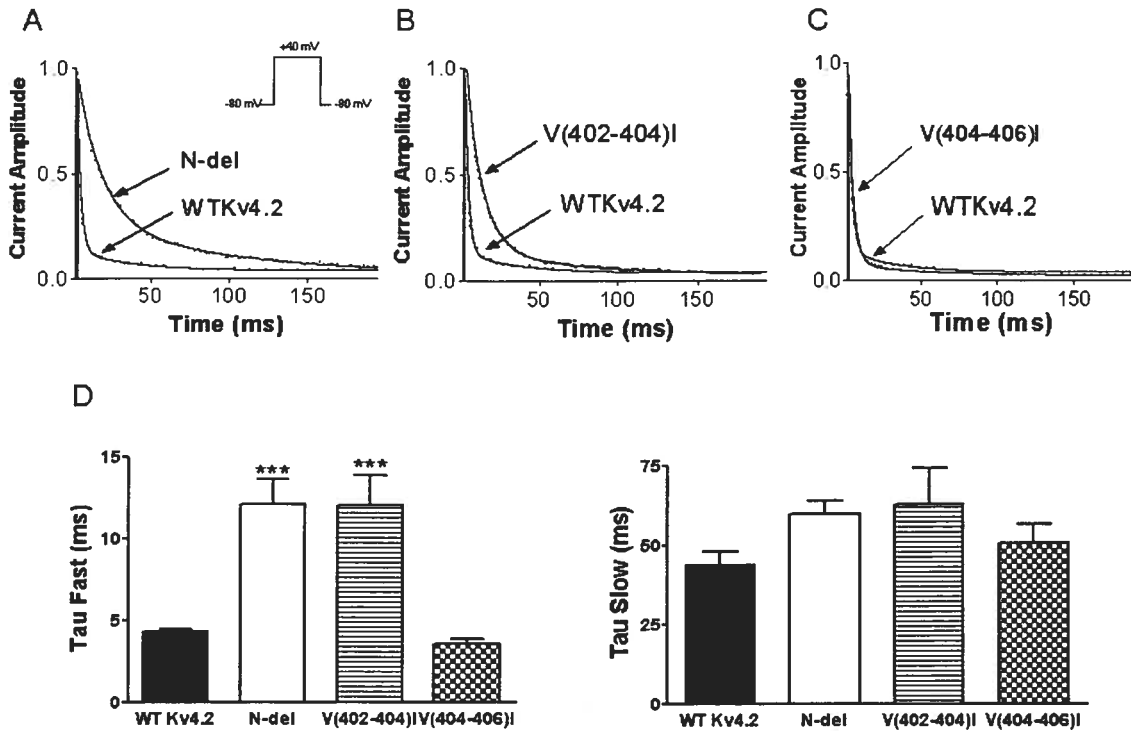
34. Wang, S., Patel, S. P., Qu, Y., Hua, P., Strauss, H. C., and Morales, M. J. (2002). Kinetic properties of Kv4.3 and their modulation by KChIP2b. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 295: 223-229
35. Wang, Z., Feng, J., Shi, H., Pond, A., Nerbonne, J. M., and Nattel, S. (1999). Potential molecular basis of different physiological properties of the transient outward K<sup>+</sup> current in rabbit and human atrial myocytes. *Circ.Res.* 84: 551-561

**VIII- Tables**

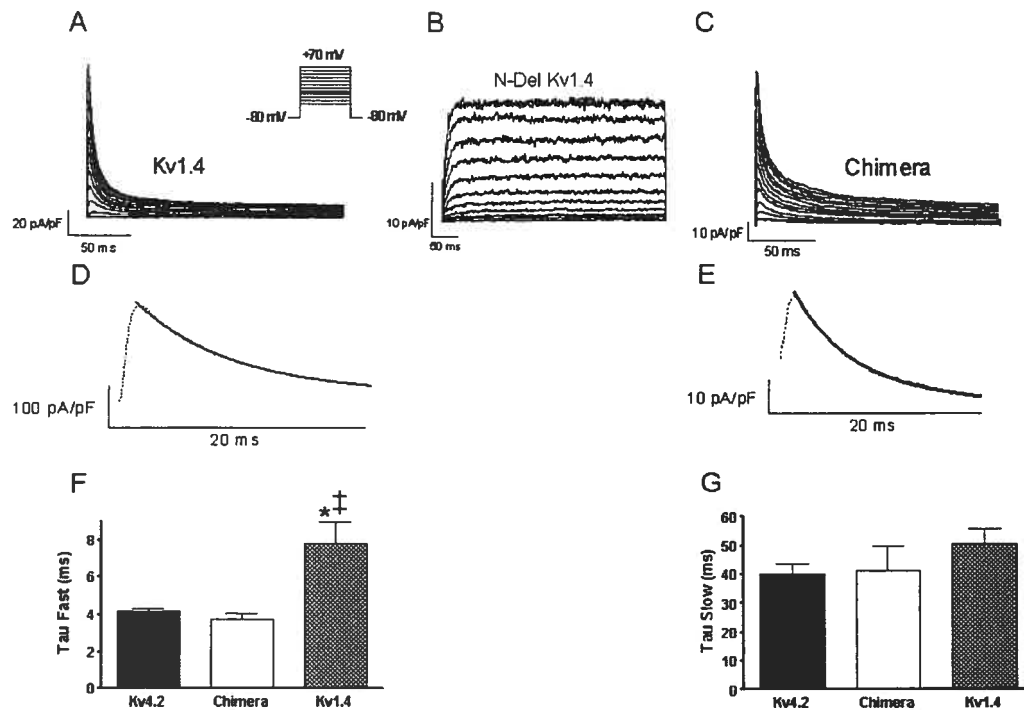
Current density +50 mV)	No KChIP2 (pA/pF)	+KChIP2 (pA/pF)	Fold increase
Kv4.2	117±22	464±105	4.0
V(402-404)I	144±49	586±173	4.1
Kv1.4	400±90	420±144	1.1
Chimera	25±9	123±26	4.9

**Table 1** Effect of KChIP2 on current density

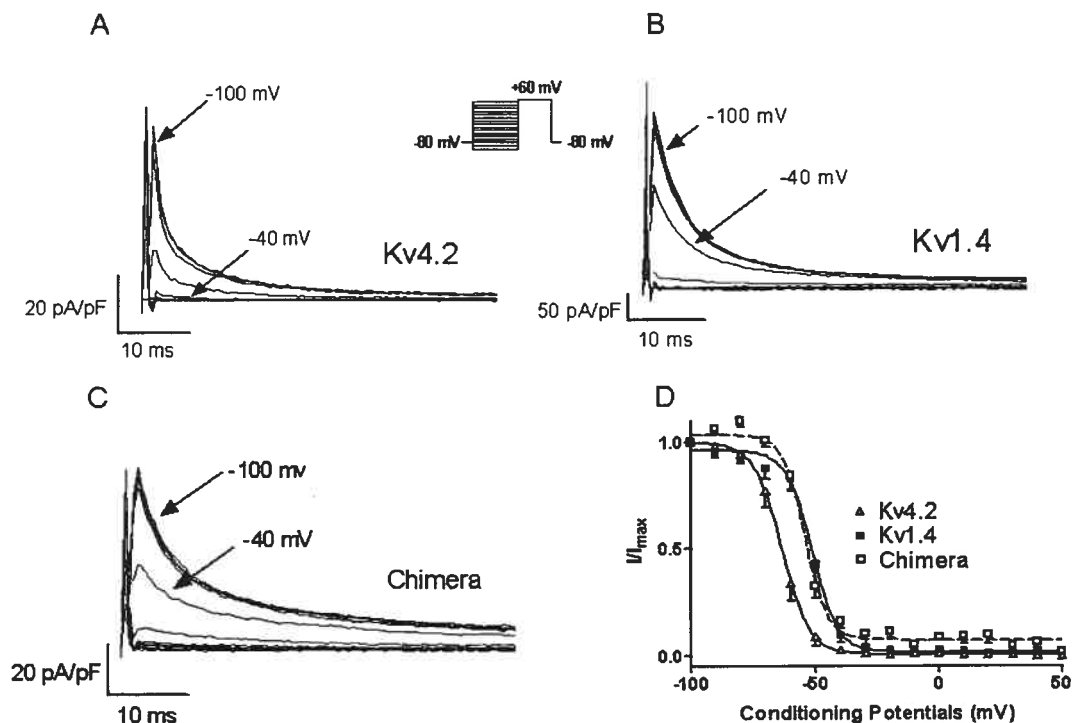
## IX- Figures and figure legends



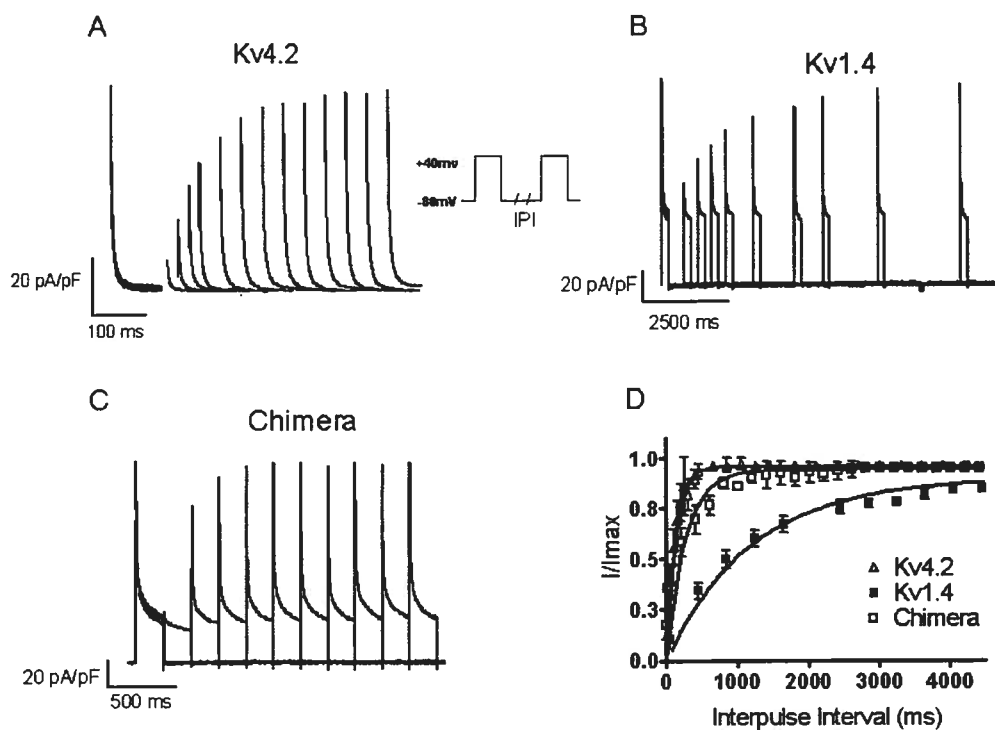
**Figure 1:** The effects of N-terminal deletion and valine mutations on Kv4.2 current. Currents recorded in COS-7 cells expressing wild-type channels and A) N-delKv4.2; B) a double valine-to-isoleucine mutation at positions 402 and 404 (V[402-404]I); C) a double valine-to-isoleucine mutation at positions 404 and 406 (V[404-406]I). Inactivation time courses were well-fit by the double-exponential relations shown (dots show currents, with data reduction to allow resolution of points from fitted curves). Mean  $\pm$  SEM fast-phase (Tau fast, D) and slow-phase (Tau slow, E) time-constants. \*\*\* $P < 0.001$  vs. WT-Kv4.2;  $n = 11, 10, 5$  and  $8$  for control, N-del, V(402-404)I, V(404-406)I respectively.



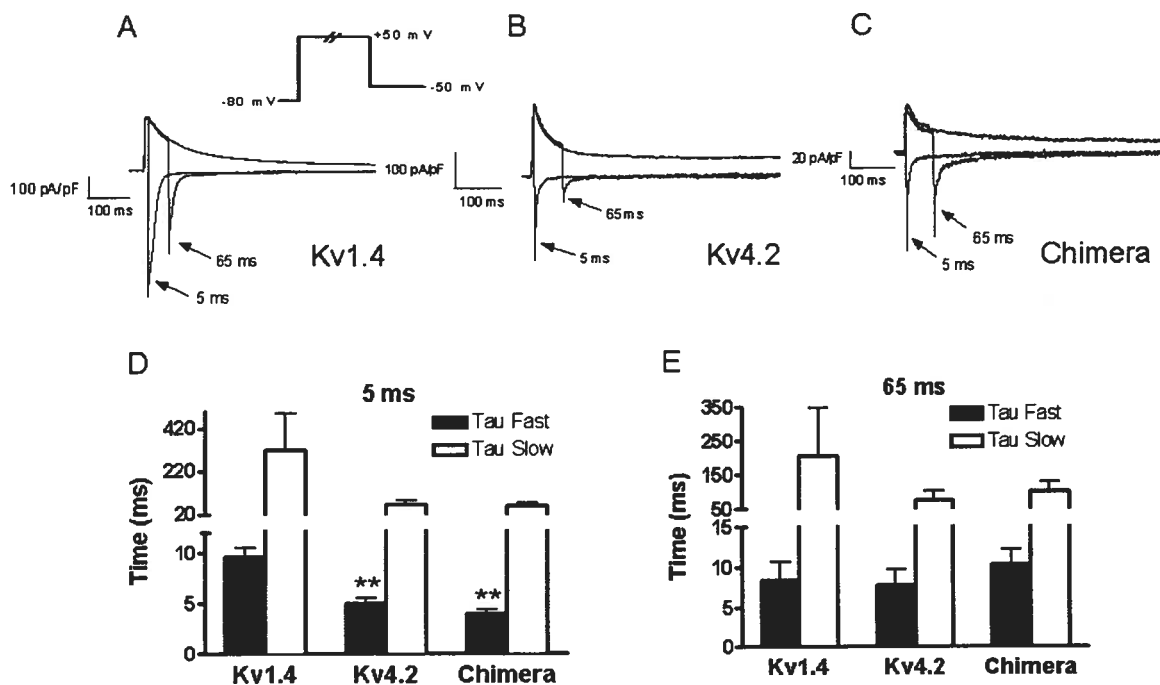
**Figure 2:** The N-terminus of Kv4.2 can restore rapid inactivation to inactivation-deficient N-terminal deleted Kv1.4-subunit (N-del Kv1.4) currents. Currents recorded from COS-7 cells expressing A) wild type Kv1.4 (Kv1.4), B) N-DelKv1.4, C) a chimeric protein constructed by linking the N-terminal of Kv4.2 to N-del Kv1.4. Inactivation kinetics were well described by double exponential relations. The first 20 ms of the fits for WT Kv1.4 and the chimera are shown in D) and E) respectively. Mean  $\pm$  SEM values for the fast and slow time-constants are represented in F) and G) respectively ( $n=11$  cells per determination). \* $P<0.05$  vs wild type Kv4.2 (Kv4.2); ‡ $P<0.05$  vs the chimera.



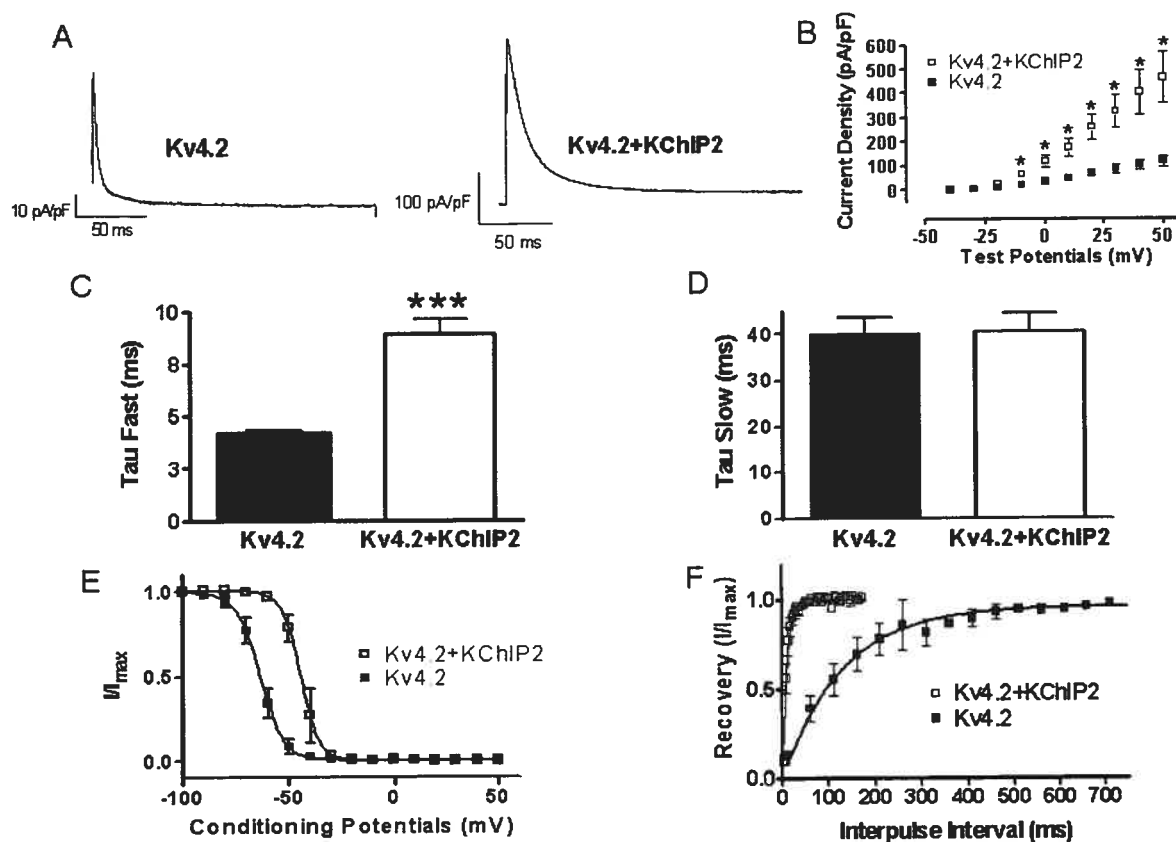
**Figure 3:** Voltage dependence of steady state inactivation of the chimera, compared to wild type Kv4.2 and Kv1.4. Voltage dependence of inactivation was assessed with a two-pulse protocol including a 900-ms prepulse from -80 mV to various conditioning potentials with 10 mV increments, followed by a 200-ms test pulse to +60 mV. Currents are shown for cells expressing A) Kv4.2, B) Kv1.4, C) chimera. D) Current ( $I$ ) at each conditioning prepulse potential was normalized to current ( $I_{max}$ ) with a prepulse to -100 mV. Symbols are mean  $\pm$  SEM data and curves are best-fit Boltzmann curves according to the equation:  $I/I_{max} = 1/\{1+\exp[(V_{1/2}-V)/k]\}$ , where  $V_{1/2}$  = half-maximal inactivation voltage and  $k$  = slope factor ( $n=4, 5, 8$  cells for chimeric, Kv1.4 and Kv4.2 subunits respectively).



**Figure 4:** Recovery from inactivation (reactivation) of currents resulting from expression of the chimera compared to wild type Kv4.2 and Kv1.4. A conditioning pulse from a holding potential of -80 mV to +40 mV was followed by an identical pulse at various interpulse intervals to assess recovery kinetics of **A)** Kv4.2, **B)** Kv1.4, and **C)** chimera. **D)** The test-pulse current to conditioning-pulse current ratio ( $I/I_{max}$ ) was plotted as a function of interpulse interval. Symbols are mean  $\pm$  SEM experimental data and curves are single-exponential fits ( $n=6, 5, 5$  cells for chimeric, Kv1.4 and Kv4.2 subunits respectively).

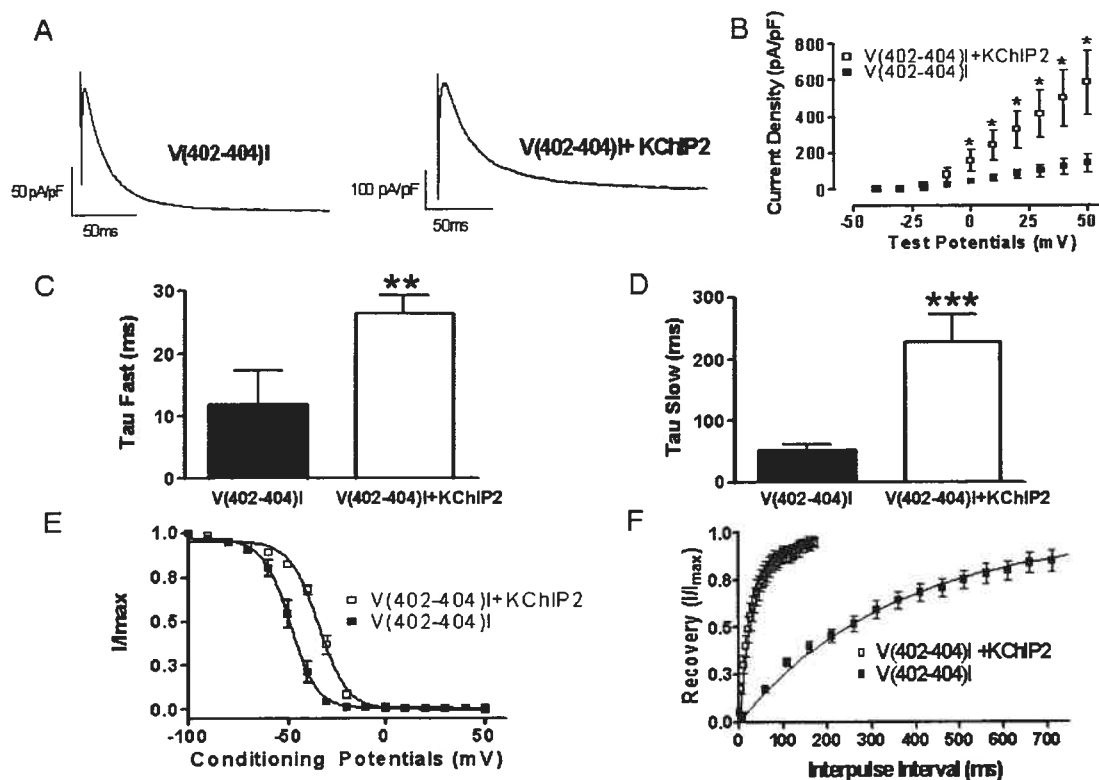


**Figure 5:** Inward currents carried by Kv1.4, Kv4.2 and the chimera upon repolarization to -50 mV after 5 and 65 ms depolarizations to +50 mV in 130 mM external  $[K^+]$  at room temperature. The currents during depolarization-repolarization protocols are superimposed on currents obtained during a maintained depolarization to +50 mV. Representative currents recorded from cells expressing WT Kv1.4 **A)** Kv4.2- **B)** and chimera **C)** with the protocol in inset. Mean data for inward-current decay kinetics following 5 **D)** and 65 ms **E)** depolarizing pulses (\*\* $P < 0.01$  vs Kv1.4,  $n = 3, 4, 3$  cells for Kv1.4, Kv4.2 and chimera respectively).

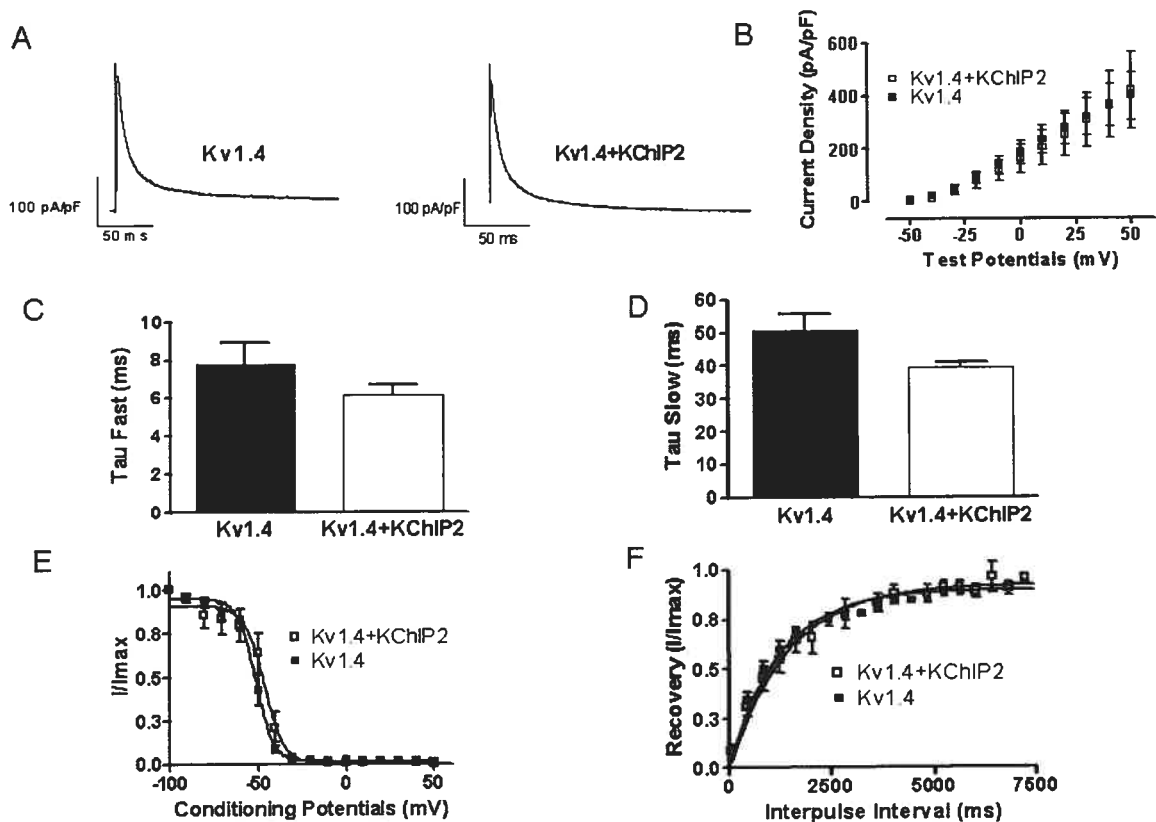


**Figure 6:** Effect of KChIP2 on Kv4.2 current properties. **A)** Current recorded from a COS-7 cell expressing Kv4.2 alone (left) or Kv4.2 co-expressed with KChIP2 (right). Current was elicited by a 200-ms depolarizing pulse from a holding potential of  $-80$  mV to  $+40$  mV. **B)** Peak current density-voltage relations are shown for Kv4.2 alone and Kv4.2+KChIP2. Symbols are mean  $\pm$  SEM experimental data. \* $P < 0.05$  versus density at same voltage without KChIP co-expression. **C)** and **D):** Mean  $\pm$  SEM fast **C)** and slow **D)** inactivation time-constants of Kv4.2 alone and Kv4.2 co-expressed with KChIP2 (\*\* $P < 0.001$  vs. Kv4.2,  $n = 11$  and 6 cells for Kv4.2 and Kv4.2+KChIP2 respectively). **E)** Mean  $\pm$  SEM inactivation voltage-dependence data for currents recorded with the conditioning prepulse protocol shown in Figure 3, from 8 and 3 cells expressing Kv4.2 and Kv4.2+KChIP2 respectively. Best-fit Boltzmann relations are shown. **F)** Time-course of recovery from inactivation of Kv4.2 alone and Kv4.2 + KChIP2 was assessed as shown in Figure 4 ( $n = 5$ , 5 cells for Kv4.2 and Kv4.2+KChIP2 respectively).

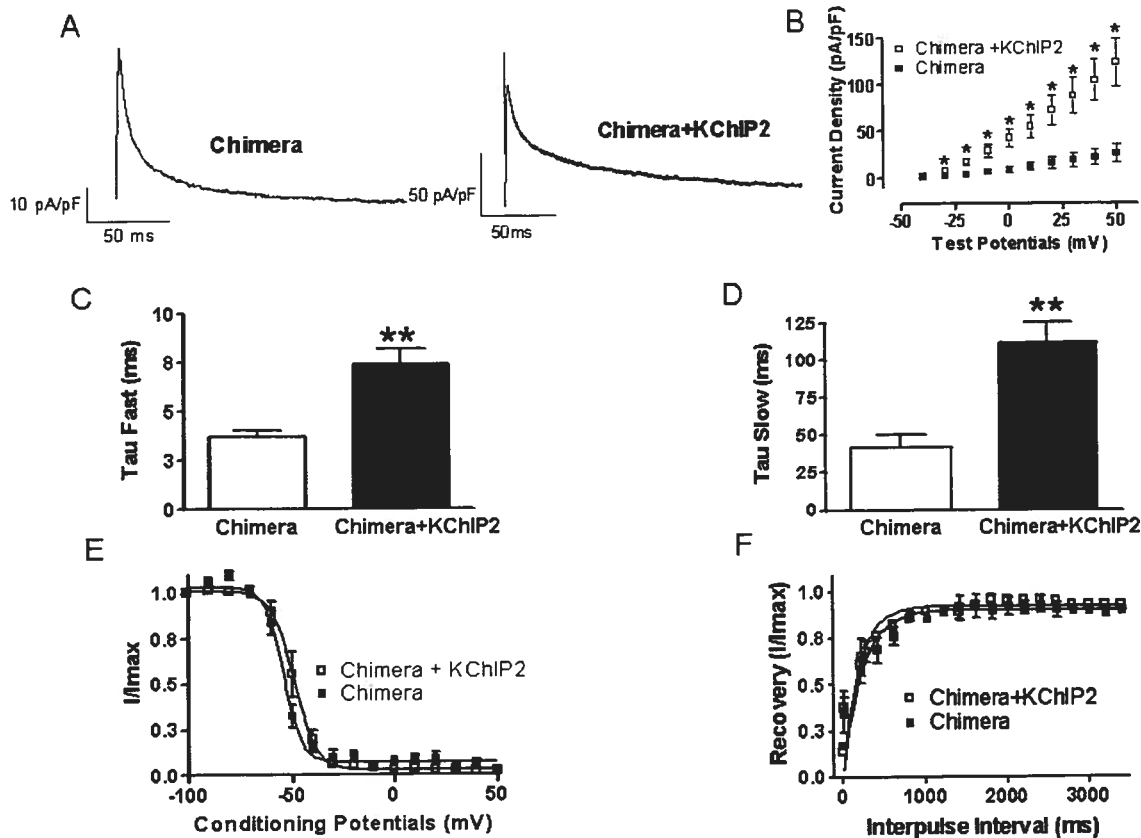




**Figure 7:** Effect of KChIP2 on double-valine mutated Kv4.2 current properties. **A)** Currents recorded from a COS-7 cell expressing V(402-404)I alone (left) or V(402-404)I co-expressed with KChIP2 (right). Current was elicited by a 200-ms pulse from a holding potential of  $-80$  mV to  $+40$  mV. **B)** Peak current density-voltage relations are shown for V(402-404)I alone and V(402-404)I+KChIP2. Symbols are mean  $\pm$  SEM experimental data.  $*P < 0.05$  versus density at same voltage without KChIP co-expression. **C), D):** Mean  $\pm$  SEM fast **C)** and slow **D)** inactivation time-constants of V(402-404)I alone and V(402-404)I co-expressed with KChIP2 ( $***P < 0.001$ ,  $**P < 0.01$  vs. V(402-404)I alone,  $n = 5$  and 6 cells without and with KChIP2 co-expression respectively). **E)** Mean  $\pm$  SEM inactivation voltage-dependence based on currents recorded with the protocol in Figure 3 from 9 and 5 cells expressing V(402-404)I, V(402-404)I +KChIP2 respectively. Best-fit Boltzmann relations are shown. **F)** Time-course of recovery from inactivation of V(402-404)I alone and V(402-404)I+KChIP2 was assessed as shown in Figure 4. ( $n = 6$ , 3 cells for V(402-404)I and V(402-404)I+KChIP2 respectively)



**Figure 8:** Effect of KChIP2 on Kv1.4 current properties. **A)** Representative current recordings upon pulsing from  $-80$  to  $+40$  mV in a COS-7 cell expressing Kv1.4 alone (left) or Kv1.4 co-expressed with KChIP2 (right). **B)** Peak current density-voltage relations are shown for Kv1.4 alone and Kv1.4+KChIP2. Symbols are mean  $\pm$  SEM experimental data. **C), D):** Mean  $\pm$  SEM fast **C)** and slow **D)** inactivation time-constants of Kv1.4 alone and Kv1.4 co-expressed with KChIP2 at  $+40$  mV ( $n = 5$  and  $14$  cells respectively). **E)** Mean  $\pm$  SEM inactivation voltage-dependence based on currents recorded with the protocol in Figure 3 in  $9$  and  $5$  cells expressing Kv1.4, Kv1.4+KChIP2 respectively. Best-fit Boltzmann relations are shown. **F)** Time-course of recovery from inactivation of Kv1.4 alone and Kv1.4 +KChIP2 was assessed as illustrated in Fig 4 ( $n = 5$ ,  $4$  cells for Kv1.4 and Kv1.4+KChIP2 respectively).



**Figure 9:** Effect of KChIP2 on Kv4.2 N-terminal/N-terminal deleted Kv1.4 chimera current properties. **A)** Representative current recorded upon depolarization from  $-80$  to  $+40$  mV in a COS-7 cell expressing the chimera alone (left) or chimera plus KChIP2 (right). **B)** Peak current density-voltage relations for chimera alone and chimera +KChIP2. Symbols are mean  $\pm$  SEM experimental data. \* $P < 0.05$  versus density at same voltage without KChIP co-expression. **C), D):** Mean  $\pm$  SEM fast **C)** and slow **D)** inactivation time-constants of chimera alone and chimera co-expressed with KChIP2 ( $n = 7$  and  $11$  cells respectively). **E)** Mean  $\pm$  SEM inactivation voltage-dependence based on currents recorded as shown in Figure 3 from 4 and 6 cells expressing chimera, chimera +KChIP2 respectively. Best-fit Boltzmann relations are shown. **F)** Time-course of recovery from inactivation of chimera alone and chimera +KChIP2 assessed as shown in Figure 4. ( $n = 4$ , 4 cells for the chimera and chimera +KChIP2 respectively).

**CHAPITRE IV: CANINE VENTRICULAR KCNE2  
EXPRESSION RESIDES PREDOMINANTLY IN  
PURKINJE FIBERS**

Ce manuscrit a été publié dans la revue *Circulation Research*, 2003; 93: 189-191

# Canine Ventricular KCNE2 Expression Resides Predominantly in Purkinje Fibers

**Marc Pourrier\*, Stephen Zicha\*, Joachim Ehrlich, Wei Han, Stanley Nattel**

**Short title:** MiRP1 in cardiac Purkinje tissue

**Subject codes:** [5], [32]

**Word count:** 2196

---

\*Both authors contributed equally and share first authorship.

Department of Medicine (M.P., S.Z., W.H., S.N.), Department of Pharmacology (M.P.) University of Montreal; Department of Pharmacology, McGill University (S.Z., S.N.), Montreal, Quebec, Canada.

Correspondence: Stanley Nattel, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger St E, Montreal, Quebec, Canada, H1T 1C8. Tel.: (514)-376-3330; Fax: (514)-376-1355; E-mail [nattel@icm.umontreal.ca](mailto:nattel@icm.umontreal.ca)

**I- Abstract**

Mutations in minK-related peptide 1 (MiRP1), the product of the *KCNE2* gene, have been associated with malignant ventricular arrhythmia syndromes related to impaired repolarization. MiRP1 interacts with a variety of ion-channel  $\alpha$ -subunits, dysfunction of which could account for arrhythmia syndromes; however, the observation of very low-level expression of MiRP1 in ventricular tissue has led to doubts about its relevance. The specialized His-Purkinje system plays a key role in cardiac electrophysiology and is an important contributor to ventricular arrhythmias related to abnormal repolarization. We examined the relative abundance of MiRP1 in canine Purkinje versus ventricular tissue, and found much greater expression at both mRNA and protein levels in Purkinje tissue. Thus, the cardiac Purkinje system is a strong candidate to play a role in arrhythmic syndromes due to MiRP1 abnormalities.

**Key Words:** long-QT syndromes ion-channel proarrhythmia

## **II- Introduction**

Mutations in minK-related peptide 1 (MiRP1), the *KCNE2* gene product, produce malignant ventricular arrhythmia syndromes related to impaired repolarization.<sup>1-3</sup> MiRP1 physically interacts with, and alters the properties of currents carried by, a wide range of  $\alpha$ -subunit proteins, including delayed-rectifier  $K^+$ -current subunits HERG<sup>1-4</sup> and KvLQT1,<sup>5</sup> transient-outward  $K^+$ -current subunits Kv4.2/4.3<sup>6,7</sup> and Kv3.4<sup>8</sup> and hyperpolarization-activated cation subunits.<sup>9</sup> Functional alterations in these channels could impair repolarization and contribute to arrhythmogenesis; however, MiRP1 mRNA expression is very low in ventricular muscle.<sup>9</sup> The His-Purkinje tissue of the cardiac specialized conducting system is particularly prone to arrhythmogenic early afterdepolarizations<sup>10</sup> and may have a prime role in polymorphic ventricular tachyarrhythmias.<sup>11</sup> The mass of cardiac Purkinje tissue is small; therefore, gene expression in ventricular muscle does not necessarily reflect Purkinje fiber expression. We speculated that MiRP1 expression might be particularly strong in cardiac Purkinje tissue, accounting for a role of MiRP1 protein in long QT syndromes despite overall low-level ventricular expression. We therefore applied competitive reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), real time PCR and Western blot to compare MiRP1 expression in canine ventricular muscle versus Purkinje fiber tissue.

## **III- Materials and Methods**

### **III-1 Competitive RT-PCR and Real time PCR**

Adult mongrel dogs (20-30 kg) were anesthetized with pentobarbital (30 mg/kg/iv). Total RNA was isolated from snap-frozen dog SA node, right atrium, left ventricle and Purkinje fiber false tendon samples homogenized in Trizol Reagent (Ambion). Following phenol/chloroform extraction, RNA was quantified based on spectrophotometric absorbance at 260 nm and its integrity confirmed on a denaturing agarose gel. Degenerate primers were designed based on other MiRP1 species-sequences in GenBank. The PCR product was sequenced and nested primers were

designed based on the dog-specific sequence. Competitive RT-PCR was conducted to compare PF, SA node and ventricular RNA. As already described in detail,<sup>1</sup> RNA mimics (internal standards) were created with a 460-bp rabbit  $\alpha$ -actin sequence flanked at either end by gene-specific primer (GSP) sequences. An 8-nucleotide linker (GGCCGCGG) homologous to the 3'-end sequence of the T7 promoter was added to the 5' end of the forward mimic primer. The T7 promoter sequence allowed synthesis of mimic RNA by in vitro transcription. Serial 10-fold dilutions of mimic were mixed with 1- $\mu$ g sample RNA in 20- $\mu$ L reaction mixtures for reverse transcription to synthesize first strand cDNA. The RT product was used as a template for subsequent PCR with GSPs. Competitive RT-PCR was conducted and analyzed separately for each sample from each heart. The PCR products were visualized under ultraviolet light and images captured with a "Nighthawk" camera (PDI). Bands were quantified by densitometry with Quantity One software (PDI). Target-gene mRNA quantities in initial samples were determined from graphs of the logarithm of target/mimic concentration ratios versus logarithm of mimic concentration for a series of reactions for each sample. (The X-axis intercept of best-fit regression lines of the form shown in Figure 1B ( $r$ 's  $>0.98$ ) indicates the logarithm of the target gene concentration in each sample, as previously described.<sup>1</sup>) MiRP1 transcript concentrations (amol/ $\mu$ g total RNA) were calculated by dividing the initial amount of target mRNA by the molecular weight of the PCR product (number of nucleotides  $\times$  average molecular mass of a single nucleotide, 310).

Two-step real time PCR was conducted with the Perkin-Elmer Gene Amp 5700 sequence detection system. Real-time PCR was run in the presence of a double-stranded DNA binding dye (SYBR green, Applied Biosystems). GAPDH was used as an internal standard, and all MiRP1 results were normalized to GAPDH data obtained from the same samples at the same time. A standard curve with 400, 100, 10, 1, 0.1 ng of Purkinje fiber total RNA was run in duplicate for each experiment. A single peak in the dissociation plot as well as a single band in a diagnostic electrophoresis gel were observed, confirming amplification of MiRP1.



### III-2 Protein Isolation and Western Blot

Adult mongrel dogs (20-30 kg) were anesthetized with pentobarbital (30 mg/kg/iv), and their hearts removed and immersed in Tyrode solution equilibrated with 100% O<sub>2</sub>. Purkinje fiber false tendons (excised from both ventricles) and left ventricular mid-myocardial samples were fast-frozen in liquid-N<sub>2</sub>. In some experiments, samples of aorta, lung and ileum were also obtained. Membrane protein fractions were isolated with 5-mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 2-mmol/L EDTA, 5- $\mu$ g/mL leupeptin, 10- $\mu$ g/mL benzamidine, and 5- $\mu$ g/mL soybean trypsin inhibitor followed by tissue homogenization. After centrifugation (16000 rpm, 20 minutes), membrane pellets were resuspended in 75-mmol/L Tris (pH 7.4), 2-mmol/L EDTA, 12.5-mmol/L MgCl<sub>2</sub> and stored at -80°C. Protein concentration was determined with the Bradford method. Samples (60- $\mu$ g protein) were denatured in Laemmli buffer. All procedures were performed at 4°C. Membrane proteins were fractionated on 12% SDS-polyacrylamide gels and transferred electrophoretically to Immobilon-P polyvinylidene fluoride membranes (Millipore) in 25-mmol/L Tris-base, 192-mmol/L glycine and 5%-methanol at 30 V for 20 minutes. Membranes were blocked and then incubated with primary antibody (MiRP1, 1:150, Santa Cruz) for 18 hours at 4°C. After washing and re-blocking, membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated donkey-anti-goat IgG secondary antibody (1:10,000, Santa Cruz). Antibody detection was performed with Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin-Elmer Life Sciences). Separate determinations were obtained for each sample in each heart. Antibody preincubation for 1 hour at room temperature with antigenic peptide (5/1 ratio) was performed as one index of band specificity. Each membrane protein sample was blotted with anti-GAPDH as well as anti-MiR1 and all MiRP1 band densities were normalized to the corresponding GAPDH band density to control for protein loading.

### III-3 Cell culture, immunocytochemistry

Chinese Hamster Ovary (CHO) cells (ATCC) were cultured at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in F12 medium (GIBCO) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Bio-Media) and 100 U/mL penicillin/ 100 µg/mL streptomycin (GIBCO). Cells were studied after transfection with 1 µg of MiRP1 cDNA subcloned into PCI/neo vector (a kind gift from Dr. Alvin Shrier of McGill University, Montreal, Canada). Mock-transfected cells (without cDNA) served as negative controls for immunocytochemistry and Western blot.

For immunofluorescent studies, CHO cells were passed onto glass coverslips prepared with 15 µg/ml laminin (Sigma) for 1 hour. Cells were then fixed (20 minutes) with 2% paraformaldehyde (Sigma), washed 3 times (5 minutes) with PBS, then blocked with 2% normal donkey serum (Jackson), and permeabilized with 0.2% Triton X-100 (Sigma) for one hour. Transfected and non-transfected cells were incubated overnight (4°C) with the primary anti-MiRP1 antibody (raised in goats, Santa Cruz) at 1:100 dilution. The following day, cells were washed 3 times for 5 minutes with Phosphate-buffered saline solution (PBS) and incubated with secondary antibody for 1 hour (anti-goat IgG with fluorescent isothiocyanate [FITC], 1:400). Confocal microscopy was performed with a Zeiss LSM-510 system. FITC (green) was excited at 488 nm with an Argon Laser, emitting fluorescence at 525 nm.

### III-4 Statistical Analysis

Data are expressed as mean±SEM. Statistical comparisons were performed with ANOVA followed by Student's *t*-test with Bonferroni correction. A two-tailed  $P < 0.05$  was taken to indicate statistical significance.

## **IV- Results**

### **IV-1 Expression of MiRP1 mRNA and Protein in Purkinje Fibers**

Figure 1A shows representative competitive RT-PCR gels. Upper bands represent RNA mimic products and lower bands are co-amplified target genes (MiRP1). Mimic signals in both ventricle and Purkinje fibers are similar, whereas MiRP1-gene bands are clearly stronger in Purkinje fibers. The lower bands were sequenced (GenBank accession no. AY307952) and showed 100% homology with the human MiRP1 gene<sup>2</sup>. Target/mimic band-intensity ratios decreased log-linearly with increasing mimic concentration in initial reaction mixtures (Figure 1B). Mean concentrations were  $2.6 \pm 1.3$  amol/ $\mu$ g RNA for Purkinje fibers,  $2.7 \pm 1.1$  amol/ $\mu$ g for sinoatrial node and  $0.19 \pm 0.05$  amol/ $\mu$ g RNA for ventricular muscle (Figure 1C). Similarly, real-time RT-PCR showed MiRP1 mRNA expression to be substantially greater in Purkinje fibers than in ventricle (Figure 1D). The ratio of Purkinje fiber MiRP1 expression to that in other tissues was greatest for ventricle, intermediate for atrium and least for sinoatrial node (Figure 1D).

Western blots detected a band at 25 kDa (the expected molecular mass for MiRP1) in both Purkinje fibers and ventricle, with a greater intensity in Purkinje tissue (Figure 2A). The 25-kDa bands disappeared after antibody pre-incubation with antigenic peptide. MiRP1 band intensities (normalized to GAPDH) were substantially stronger in Purkinje fibers than in ventricular muscle ( $p \leq 0.001$ , Figure 2B). No equivalent band was present in Western blots of canine aorta or ileum (consistent with previous mRNA data<sup>12</sup>), nor lung (Figure 2C). The MiRP1 antibody detected a 25-kDa band in MiRP1-transfected CHO cells (Figure 2D), but not in non-transfected cells. A clear membrane signal was detected with MiRP1 antibody upon confocal imaging of MiRP1-transfected, but not non-transfected, cells (On-line Figure).

## V- Discussion

There is convincing evidence for the involvement of KCNE2 mutations in cardiac arrhythmia syndromes involving abnormal repolarization.<sup>1-3</sup> It is also clear that MiRP1 alters the ion-channel function of a variety of K<sup>+</sup>-channel  $\alpha$ -subunits.<sup>4-8</sup> KCNE2 mutations disrupt the function of a range of subunits, leading to the suggestion of promiscuous interactions with conserved mechanisms.<sup>13</sup>

A difficulty in rationalizing the role of MiRP1 mutations in cardiac arrhythmia syndromes is the extremely low-level ventricular expression of MiRP1. Yu et al found MiRP1 mRNA to be barely detectable in the ventricles, <4% of signal intensity in the sinoatrial node<sup>9</sup>. In the present study, we found that mRNA and protein expression of MiRP1 in Purkinje fibers is much stronger than in ventricle. Cardiac Purkinje fibers play a key role in cardiac electrophysiology and arrhythmias.<sup>14</sup> Although Purkinje fibers were widely-used for classical cardiac electrophysiology studies, technical difficulties in Purkinje-cell isolation and the small Purkinje tissue mass have led to much less work on cardiac Purkinje tissue with modern patch-clamp and molecular biology methods. Evidence for an important role of Purkinje tissue in Torsades de Pointes arrhythmias<sup>10,11,15</sup> and recent observations that clinical malignant ventricular tachyarrhythmias can be prevented by ablating Purkinje system triggers<sup>16</sup> have led to resurgent interest in the physiology and pathophysiology of Purkinje tissue. Remodelling of Purkinje fiber ionic properties by heart failure sensitizes them to action-potential prolongation by class III antiarrhythmic agents, potentially explaining the predisposition of heart failure patients to Torsades de Pointes arrhythmias.<sup>17</sup>

Virtually all of the ion-channels known to interact with MiRP1 are expressed in Purkinje fiber tissue.<sup>18</sup> Further clarification of the specific ion-channel interactions mediating MiRP1 function awaits development of more specific probes. Purkinje fiber repolarization is much more susceptible to disruption than that of ventricular muscle.<sup>10</sup> MiRP1 mutations that impair the function of K<sup>+</sup>-channel  $\alpha$ -subunits mediating Purkinje-cell repolarization could therefore cause excess Purkinje-fiber

action potential prolongation and arrhythmogenic early afterdepolarizations, leading to arrhythmic syndromes.

## **VI- Acknowledgments**

The authors thank Chantal St-Cyr and Evelyn Landry for technical assistance, the Canadian Institutes of Health Research and the Quebec Heart Foundation for research funding and France Thériault for secretarial help.

## **VII- References**

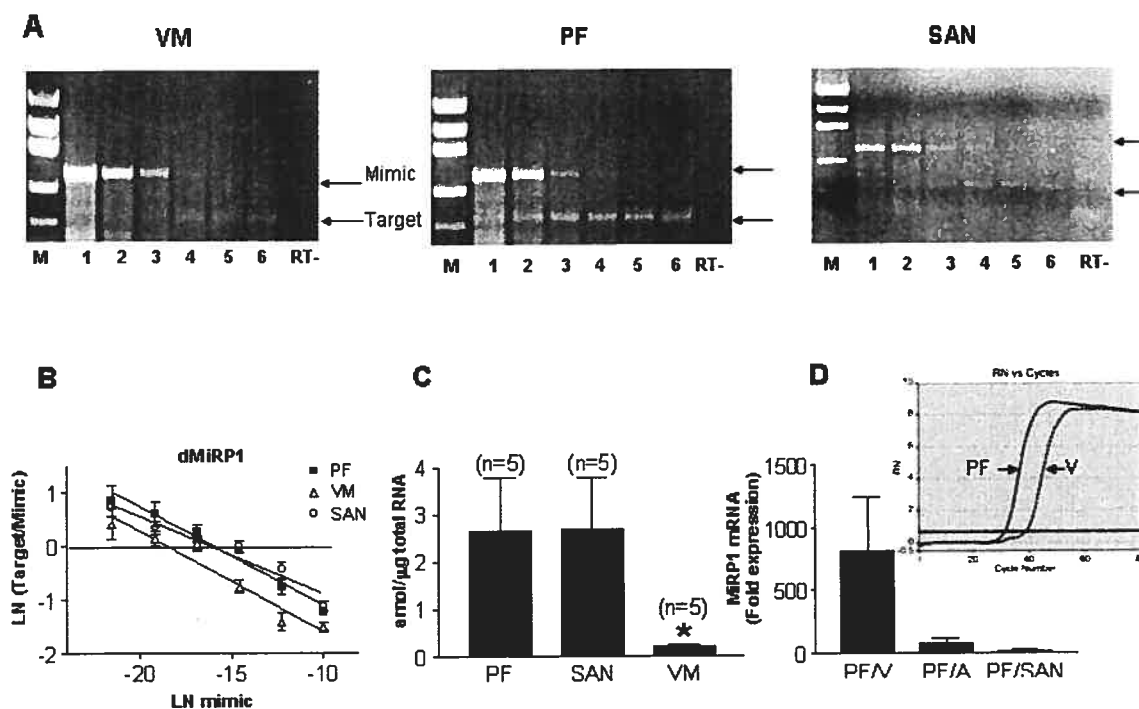
1. Abbott GW, Sesti F, Splawski I, Buck ME, Lehmann MH, Timothy KW, Keating MT, Goldstein SA. MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell*. 1999;97:175-187.
2. Isbrandt D, Friederich P, Solth A, Haverkamp W, Ebneith A, Borggreffe M, Funke H, Sauter K, Breithardt G, Pongs O, Schulze-Bahr E. Identification and functional characterization of a novel KCNE2 (MiRP1) mutation that alters HERG channel kinetics. *J Mol Med*. 2002;80:524-532.
3. Sesti F, Abbott GW, Wei J, Murray KT, Saksena S, Schwartz PJ, Priori SG, Roden DM, George AL, Jr., Goldstein SA. A common polymorphism associated with antibiotic-induced cardiac arrhythmia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:10613-10618.
4. Mazhari R, Greenstein JL, Winslow RL, Marban E, Nuss HB. Molecular interactions between two long-QT syndrome gene products, HERG and KCNE2, rationalized by in vitro and in silico analysis. *Circ Res*. 2001;89:33-38.
5. Tinel N, Diochot S, Borsotto M, Lazdunski M, Barhanin J. KCNE2 confers background current characteristics to the cardiac KCNQ1 potassium channel. *EMBO J*. 2000;19:6326-6330.
6. Deschenes I, Tomaselli GF. Modulation of Kv4.3 current by accessory subunits. *FEBS Lett*. 2002;528:183-188.
7. Zhang M, Jiang M, Tseng GN. minK-related peptide 1 associates with Kv4.2 and modulates its gating function: potential role as beta subunit of cardiac transient outward channel? *Circ Res*. 2001;88:1012-1019.
8. Pourrier, M., Han, W., Zicha, S, Wang, Z, and Nattel, S. MiRP1-Kv3.4 interaction: Possible role in Purkinje cell electrophysiology? *Circulation* 106 (suppl II)(19), II-47 (Abstract). 11-5-2002. Ref Type: Abstract

9. Yu H, Wu J, Potapova I, Wymore RT, Holmes B, Zuckerman J, Pan Z, Wang H, Shi W, Robinson RB, El Maghrabi MR, Benjamin W, Dixon J, McKinnon D, Cohen IS, Wymore R. MinK-related peptide 1: A beta subunit for the HCN ion channel subunit family enhances expression and speeds activation. *Circ Res.* 2001;88:E84-E87.
10. Nattel S, Quantz MA. Pharmacological response of quinidine induced early afterdepolarisations in canine cardiac Purkinje fibres: insights into underlying ionic mechanisms. *Cardiovasc Res.* 1988;22:808-817.
11. Berenfeld O, Jalife J. Purkinje-muscle reentry as a mechanism of polymorphic ventricular arrhythmias in a 3-dimensional model of the ventricles. *Circ Res.* 1998;82:1063-1077.
12. Ohya S, Asakura K, Muraki K, Watanabe M, Imaizumi Y. Molecular and functional characterization of ERG, KCNQ, and KCNE subtypes in rat stomach smooth muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002;282:G277-G287.
13. Abbott GW, Goldstein SA. Disease-associated mutations in KCNE potassium channel subunits (MiRPs) reveal promiscuous disruption of multiple currents and conservation of mechanism. *FASEB J.* 2002;16:390-400.
14. Schram G, Pourrier M, Melnyk P, Nattel S. Differential distribution of cardiac ion channel expression as a basis for regional specialization in electrical function. *Circ Res.* 2002;90:939-950.
15. El Sherif N, Chinushi M, Caref EB, Restivo M. Electrophysiological mechanism of the characteristic electrocardiographic morphology of torsade de pointes tachyarrhythmias in the long-QT syndrome: detailed analysis of ventricular tridimensional activation patterns. *Circulation.* 1997;96:4392-4399.
16. Haissaguerre M, Shah DC, Jais P, Shoda M, Kautzner J, Arentz T, Kalushe D, Kadish A, Griffith M, Gaita F, Yamane T, Garrigue S, Hocini M, Clementy J. Role of Purkinje conducting system in triggering of idiopathic ventricular fibrillation. *Lancet.* 2002;359:677-678.

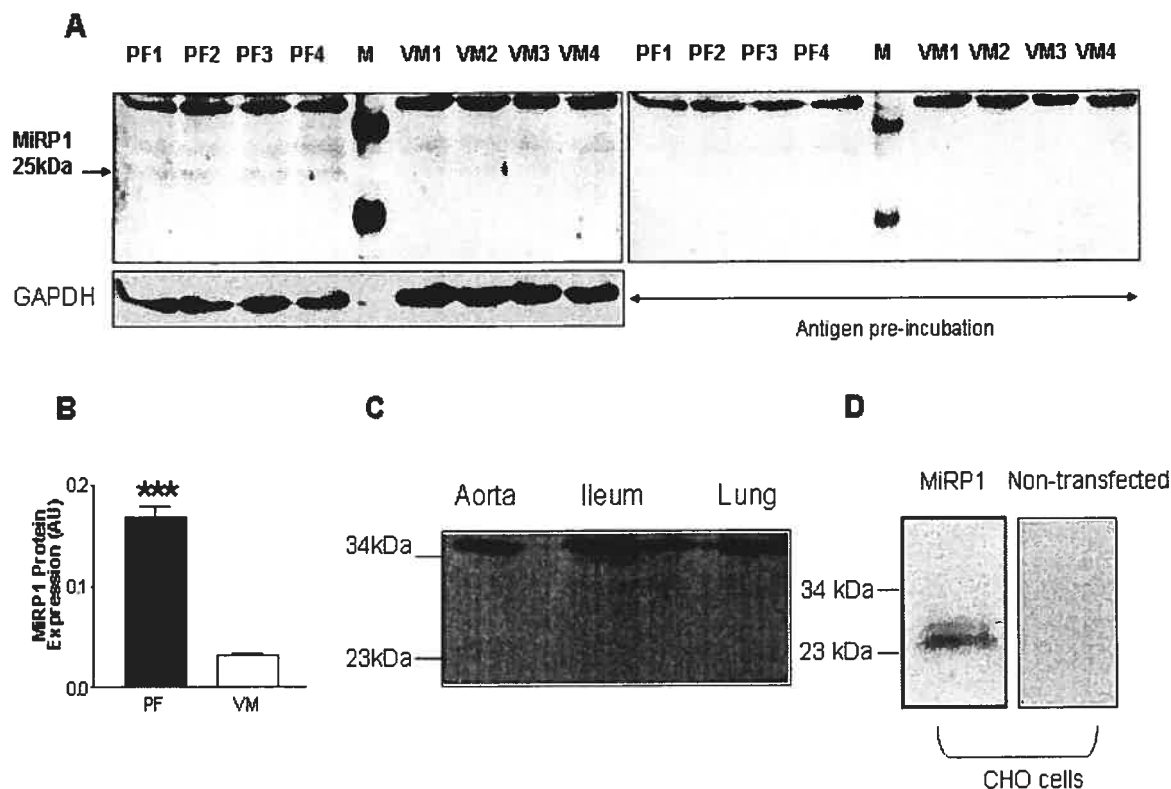
17. Han W, Chartier D, Li D, Nattel S. Ionic remodeling of cardiac Purkinje cells by congestive heart failure. *Circulation*. 2001;104:2095-2100.
18. Han W, Bao W, Wang Z, Nattel S. Comparison of ion-channel subunit expression in canine cardiac Purkinje fibers and ventricular muscle. *Circ Res*. 2002;91:790-797.



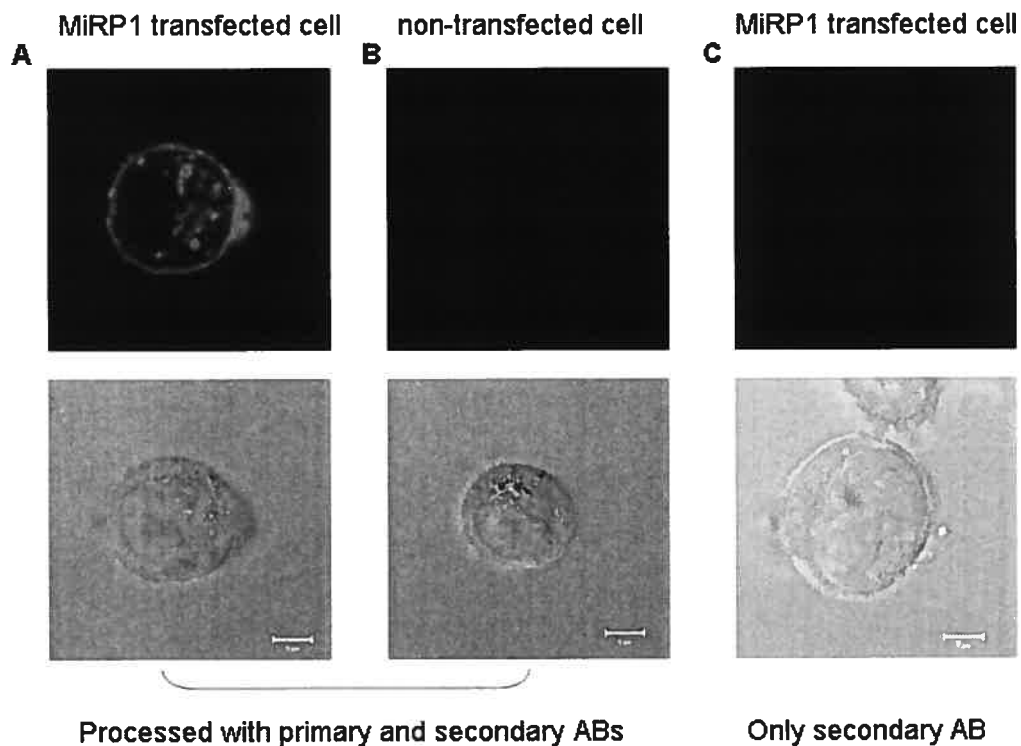
### VIII- Figures and figure legends



**Figure 1:** (A) Ethidium bromide-stained gels with products from competitive RT-PCR reactions using dog ventricular muscle (VM), Purkinje tissue (PF) and sinoatrial node (SAN). Lane 0 shows the DNA mass ladder, with signals obtained with 200, 120, 80, 60, 40 and 20 ng of mass-standards (top to bottom). Lanes 1 to 6, products from reaction mixtures containing serial 10 $\times$  dilutions from initial mimic quantity of 45.4 fg (lane 1) to  $4.5 \cdot 10^{-4}$  fg (lane 6), along with 1  $\mu$ g sample RNA, in 25  $\mu$ L. Lane 7 is an RT-negative control (mimic size = 496 bp, target = 218 bp). (B) Logarithm of amplified target MiRP1/mimic signal ratio versus RNA mimic quantity in initial reaction mixture. (C) Mean $\pm$ SEM MiRP1 transcript concentration (n=5 hearts/determination). (D) Ratio of MiRP1 mRNA expression in Purkinje fiber to that in ventricle (V), atrium (A) and SAN, as determined by real-time RT-PCR (n=12 independent heart samples/determination). Inset: Example of amplification curves for ventricular and Purkinje fiber tissue from one experiment.



**Figure 2:** MiRP1 protein expression in Purkinje fibers versus ventricle. (A) Western blots using Purkinje fiber (PF) and ventricular muscle (VM) membrane protein extracts, with identical protein quantities (60  $\mu$ g) from each of 4 different dog hearts (mass markers are at 23 and 34 kDa). A 25-kDa band corresponding to MiRP1 (indicated) was eliminated by antigen-antibody preincubation (right panel). The same samples were probed for GAPDH, and the intensity of the corresponding bands (bottom) was used to normalize each MiRP1 signal. (B) Mean $\pm$ SEM MiRP1 band intensities after normalization to GAPDH (n=6 hearts/determination). (C) No 25-kDa signal corresponding to MiRP1 was detected by the MiRP1 antibody in aorta, ileum or lung. (D) MiRP1 antibody detected a 25-kDa band (lane 1) in MiRP1-transfected CHO cells, but no corresponding signal was detected in non-transfected CHO cells.



**“Online” Figure:** Immunofluorescent (top) and corresponding dark-field (bottom) images of CHO cells. (A) A CHO cell transfected with MiRP1. Detection with MiRP1 antibody revealed presence of the protein at the membrane surface. No signal appeared when MiRP1 antibody was applied to non-transfected cells (B) or when only the secondary antibody was applied (C).

**CHAPITRE V: THE KCNE2 GENE PRODUCT  
INTERACTS WITH Kv3.4 SUBUNITS AND  
MODIFIES THEIR IONIC CURRENT CARRYING  
FUNCTION**

Ce manuscrit est en préparation pour publication

**The KCNE2 gene product interacts with Kv3.4 subunits and modifies their ionic current carrying function.**

**Marc Pourrier, Joachim R. Ehrlich, Stephen Zicha, Gernot Schram, Stanley Nattel**

**Running title:** MiRP1-Kv3.4 Interaction

---

From Research Center, Montreal Heart Institute (MP, JRE, SZ, GS, SN), Departments of Pharmacology (MP) and Medicine (JRE, GS, SN), University of Montreal and Department of Pharmacology and Therapeutics (SZ, SN), McGill University.

Correspondence to: Stanley Nattel, Montreal Heart Institute, Research Center, 5000 Belanger Street East, Montreal HIT 1C8, Quebec, Canada. Telephone: 514-376-3330; Fax: 514-376-1355; [REDACTED] [REDACTED]

## **I- Summary**

Although mutations of the *KCNE2* gene product, minK-related peptide 1 (MiRP1), are associated with cardiac long QT arrhythmia syndrome, the role of MiRP1 in cardiac electrophysiology remains unclear. We have shown that MiRP1 is expressed strongly in cardiac Purkinje fibers, which preferentially generate early afterdepolarizations believed to cause long QT syndrome arrhythmias. We have also shown strong expression of the Kv3.4 gene, encoding a transient outward current, in Purkinje fibers. The present study evaluated whether MiRP1 is capable of physical interaction with Kv3.4 protein and whether co-expression alters the current-carrying properties of Kv3.4 subunits. When MiRP1 and Kv3.4 were co-expressed in CHO cells, they co-immunoprecipitated and co-localized on confocal microscopy. Whole-cell patch clamp at 37°C was used to study Kv3.4 and Kv3.4/MiRP1 in CHO cells. Kv3.4 decay was bi-exponential ( $\tau_{\text{fast}}=33\pm6$  ms;  $\tau_{\text{slow}}=279\pm38$  ms). MiRP1 co-expression slowed Kv3.4 inactivation ( $\tau_{\text{fast}}=276\pm53$  ms;  $\tau_{\text{slow}}=2580\pm323$  ms), decreasing the portion in the fast phase from  $74\pm6$  to  $57\pm5\%$  and leaving a substantial sustained component as observed for native Purkinje transient outward current recorded with comparable pulse durations. Co-expression did not alter inactivation voltage-dependence, but altered activation voltage-dependence (Kv3.4:  $V_{1/2}=13.3\pm1.3$  mV; Kv3.4/MiRP1:  $V_{1/2}=19.3\pm0.8$  mV,  $P<0.05$ ), recovery from inactivation (Kv3.4:  $\tau=204\pm123$  ms; Kv3.4/MiRP1:  $\tau_s=1327\pm188$  ms) and sensitivity to tetraethylammonium. These data indicate that MiRP1 interacts with Kv3.4 both physically and functionally, and raise the possibility that MiRP1-Kv3.4 interaction may contribute to the electrical activity of cardiac Purkinje fibers.

## **II- Introduction**

MinK related peptide 1 (MiRP1), encoded by the *KCNE2* gene (1), is believed to function as an accessory ( $\beta$ ) subunit in the heart, associating with pore-forming ( $\alpha$ ) subunits of cardiac ion channels and playing a significant role in ion-channel function (2). Mutations in *KCNE2* are associated with congenital long QT syndrome (LQTS),

consisting of excess prolongation of the electrocardiographic QT interval and malignant cardiac arrhythmias (1, 3). MiRP1 has been shown to interact with a variety of  $\alpha$ -subunits, including the rapid delayed rectifier ( $I_{Kr}$ ) subunit product of the *human ether-a-go-go related gene (HERG)* (1), the transient outward current ( $I_{to}$ ) subunit Kv4.2 (4), and the pacemaker current ( $I_f$ ) subunit HCN (5). It is unclear which of these subunit interactions mediate the physiological function of MiRP1, nor whether MiRP1 interacts with additional  $\alpha$ -subunits to contribute to cardiac ion-channel function.

Cardiac Purkinje fibers are responsible for the rapid propagation of the cardiac impulse to the ventricles, and preferentially generate early afterdepolarizations which are central to the formation of ventricular arrhythmias associated with LQTS (6). The expression of MiRP1 in working ventricular muscle is so low that questions have been raised about its relevance in the ventricles (4); however, MiRP1 expression is very strong in Purkinje fibers (7). Kv3.4  $\alpha$ -subunits are also expressed particularly strongly in cardiac Purkinje tissue (8), and have some properties, including sensitivity to tetraethylammonium, TEA (9, 10), which resemble, but are not identical to, characteristic features of cardiac Purkinje  $I_{to}$  (6).

Since both MiRP1 and Kv3.4 are expressed strongly in cardiac Purkinje fibers, we considered the possibility that they may be capable of physical interactions that produce ion-channel function when both are present that is different from the ion-channel function resulting from Kv3.4 expression alone. We therefore designed the present studies to determine whether MiRP1 is capable of physical interaction with Kv3.4 and, if so, whether co-expression of MiRP1 alters the electrophysiological properties of currents resulting from Kv3.4 expression in a mammalian cell line.

### **III- Experimental procedures**

#### **III-1 cDNA preparation.**

The human isoform of MiRP1 (in pAlter max) tagged with a *c-myc* epitope at the extracellular domain of MiRP1 (kindly provided by Gea-Ny Tseng) (4) was used

to perform immunodetection and co-immunoprecipitation. WT hMiRP1 in PCI/neo (kindly provided by Dr. Alvin Shrier) was used for electrophysiological study. Kv3.4 cDNA cloned in pCDNA1/Amp vector (kind gift from B. Rudy) was used for Kv3.4 expression.

### **III-2 Cell culture.**

Chinese hamster ovary (CHO) cells (ATCC) were maintained at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in F-12 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Invitrogen) along with 10 mL/L of solution containing 100 Units/mL penicillin G-Na and 100 µg/mL streptomycin. For cell transfection, ~2×10<sup>5</sup> cells were plated onto 35-mm culture dishes and allowed to grow to ~80% confluence (24 h). Kv3.4 cDNA (0.3 µg, alone or with 0.6 µg MiRP1 cDNA) was transfected along with CD8 cDNA (0.1 µg) in piXCD8 plasmid as a transfection marker, lipofectamine (5.5 µL) and 6 µL of Plus reagent (GIBCO) to a final volume of 200 µL in 800 µL of cell suspension. After 5-6 h incubation (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), FBS was added to a final FBS concentration of 10%. Following incubation, cells were trypsinized, re-plated for 2-3 additional days, then washed and resuspended with F12 complete medium. Anti-CD8 beads (Dynabeads M450, Dynal) were added to detect successfully-transfected cells.

### **III-3 Recording of ionic currents**

Whole-cell patch-clamp recordings were performed as previously described in detail (11). Currents were recorded with an Axopatch 200B amplifier and pClamp6 software (Axon). Currents were evoked from a holding potential (HP) of -80 mV, with the use of 900 ms pulses at 0.1 Hz for Kv3.4 and (because of slower inactivation) by 7.5 s pulses at 0.07 Hz for Kv3.4+MiRP1. Standard external solution contained (mM): 136 NaCl, 5.4 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 10 glucose, and 1 CaCl<sub>2</sub> (pH 7.4, NaOH). Borosilicate glass electrodes had tip resistances of 2-4 MΩ when filled with (mM): 0.1 GTP, 110 K-aspartate, 20 KCl, 1MgCl<sub>2</sub>, 5 Mg<sup>2+</sup>-ATP, 10 HEPES, 5 EGTA, 5 phosphocreatine (pH 7.3, KOH). Junction potentials were zeroed before formation of the membrane-pipette seal. The capacitance and series resistance



(Rs) were electrically compensated by 60-80%. Currents were sampled at 10 kHz and all recordings were performed at  $36\pm 1^\circ\text{C}$ . Transiently-transfected cells had mean capacitances of  $21.1\pm 2.5$  pF and there was no significant difference between cells transfected with Kv3.4 alone versus Kv3.4 and MiRP1.

### III-4 Co-immunoprecipitation

CHO cells were maintained and transfected in 75 cm<sup>2</sup> flask (Sarstedt) with sample cDNA (Kv3.4 or Kv3.4 and *c-myc* MiRP1) and Lipofectamine. After 24 to 48h, cells were washed with cold phosphate-buffered saline (PBS), scraped and resuspended in Lysis buffer (5-mM Tris-HCl (pH7.4), 2-mM EDTA, 5- $\mu\text{g}/\text{mL}$  leupeptin, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ -benzamidine, and 5- $\mu\text{g}/\text{mL}$  soybean trypsin inhibitor) followed by tissue homogenization (Polytron). After centrifugation, membranes were resuspended in solubilization buffer (50 mM Tris-HCl buffered to pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% nonidet P40, 0.5% sodium deoxycholate, protease inhibitor cocktail; Immunoprecipitation Protein G Kit, Roche). The lysates were precleared by incubation with 50  $\mu\text{L}$  protein G agarose beads (Roche) overnight at 4 degrees. After centrifugation (20 s, 13000 rpm), the supernatant was kept and 9  $\mu\text{g}$  of anti-Kv3.4 antibody (Alomone) added. After 4 h incubation at  $4^\circ\text{C}$ , protein G beads were added (50  $\mu\text{L}$ ) and the mixture incubated overnight at  $4^\circ\text{C}$ . Immunoprecipitates were washed with solubilization buffer, high salt buffer and low salt buffer (Immunoprecipitation Protein G Kit, Roche) and subjected to 10% SDS-PAGE gel electrophoresis with membranes exposed to anti *c-myc* antibody (Roche, 1:300). Antibody detection was performed with Western lightning chemiluminescence Reagent plus (Perkin Elmer Life Sciences).

### III-5 Immunocytochemistry

Transiently-transfected cells were grown on sterile glass coverslips for 24 h, then fixed with 2% pre-cooled paraformaldehyde containing 0.2% Triton X-100 for 20 minutes at room temperature, followed by 3 washes with PBS and blocking for 1 hour with 5% normal donkey serum (Jackson), 5% bovine serum albumin (BSA,

Sigma) and permeabilization with 0.2% Triton-X 100 (Sigma) in PBS for 1 hour. Cells were incubated overnight with the primary antibody in blocking solution at 4°C (anti-Kv3.4, 1:50 or/and anti-*c-myc*, 1:100). Negative controls included transfected cells incubated with secondary antibody alone and non-transfected cells incubated with primary antibody. After 3 washes, cells were incubated with secondary antibody (1/200 tetra-methyl-rhodamine-isothiocyanate [TRITC]- conjugated donkey anti rabbit or anti mouse IgG) for 1 hour at room temperature. After 3 subsequent washes, coverslips containing cells aliquots were mounted on slides with DABCO 0.2% and glycerol (1:1) and subjected to laser-scanning confocal microscopy (Zeiss Axiovert 100-M microscope coupled to a Zeiss LSM-510 unit).

### **III-6 Data analysis**

Group data are expressed as mean±S.E.M. Statistical comparisons were with Student's *t*-test (single pairs of data) or two-way analysis of variance (ANOVA) with one repeated measure (drug) for TEA experiments. Two-tailed  $P \leq 0.05$  was taken to indicate a statistically-significant difference. Non-linear least squares algorithms (Clampfit or Graphpad Prism 3.0) were used for curve fitting.

## **IV- Results**

### **IV-1 Kv3.4 and MiRP1 physically interact**

Immunoblotting of Kv3.4-transfected cell extracts with anti Kv3.4 showed 2 bands at ~66 kDa and 85 kDa, as previously described (12) (Figure 1A, lane 1), the denser band believed to correspond to phosphorylated (13) or glycosylated (14) Kv3.4. The bands disappeared when antibody was pre-incubated with antigenic peptide (Figure 1A, lane 2). Kv3.4 could be detected after pulldown with Kv3.4 antibody (lane 3). Bands at 14 and 25 kDa were detected by anti-*c-myc* antibody in extracts from *c-myc* MiRP1-transfected CHO cells (Figure 1B, lane 1), and not in non transfected cells (lane 2). Only the 25 kDa band was detected by anti-MiRP1 antibody (Santa Cruz Biotechnology, lane 3), in agreement with previous reports (1).

In extracts of CHO cells co-transfected with Kv3.4 and *c-myc* MiRP1 and subjected to pulldown with anti-Kv3.4 antibody, a single 25 kDa band was detected by *c-myc* antibody (Lane 4). When *c-myc* MiRP1 was transfected alone, pulled down with Kv3.4 antibody and blotted with anti-*c-myc*, no signal could be detected (lane 5). The strong ~50 kDa band in lanes 4 and 5 corresponds to anti-Kv3.4 IgG detected by the secondary antibody.

#### IV-2 Kv3.4 and MiRP1 co-localize in mammalian cells

If Kv3.4 and MiRP1 associate physically, their expression should co-localize within the cell. When *c-myc* MiRP1 was expressed alone in CHO cells, strong perinuclear localization was seen, with faint membrane staining (same observation in 12 cells) (Figure 2A). No immunostaining was seen when *c-myc*-MiRP1-expressing cells were probed with secondary antibody alone (Figure 2B) or when non-transfected cells were probed with anti-*c-myc* and secondary antibody (Figure 2C). Kv3.4-only expression followed by probing with anti-Kv3.4 revealed membrane localization with faint non-specific cytoplasm staining (Figure 2D, observed in 10 cells), with no staining present when primary anti-Kv3.4 was omitted (Figure 2E) or when Kv3.4-transfected cells were probed with anti-Kv3.4 pre-incubated with antigenic peptide (Figure 2F). When cells co-expressing Kv3.4 and MiRP1 were double-labelled with anti-Kv3.4 (pseudoblue staining, Figure 2G) and anti-*c-myc* (pink, Figure 2H) antibodies, the overlapped immunostaining pattern in purple suggested that both subunits were targeted with similar membrane localization (Figure 2I, observed in 18 cells). When incubated with secondary antibody alone, co-transfected cells showed no signal (data not shown).

#### IV-3 MiRP1 affects Kv3.4 current-carrying properties

Kv3.4 expression in CHO cells produced transient outward current (Figure 3A), as shown previously in oocytes (10). Kv3.4 activated rapidly, followed by a bi-exponential decay as shown in the inset ( $\tau_{fast} = 33 \pm 6$  ms;  $\tau_{slow} = 276 \pm 38$  ms,  $n=5$ ) with the fast phase representing  $74 \pm 6\%$  (Figures 3A and 3E). MiRP1 co-expression

slowed Kv3.4 inactivation ( $\tau_{\text{fast}} = 276 \pm 53$  ms;  $\tau_{\text{slow}} = 2580 \pm 323$  ms,  $n=6$ ,  $P < 0.01$  and  $P < 0.001$  respectively, fast-phase component decreased to  $57 \pm 5\%$ ,  $P < 0.05$ ) (Figures 3B and 3E). Current density was unchanged when Kv3.4 alone was compared to Kv3.4 with MiRP1 co-expression (Figure 3F). For example, at +40 mV, current density was  $198 \pm 60$  pA/pF for Kv3.4,  $n=5$ , and  $201 \pm 57$  pA/pF for Kv3.4+MiRP1,  $n=6$ ,  $P = \text{NS}$ . Activation voltage-dependence was assessed according to the relationship  $I_v = I_{\text{max}}(V - V_r)(G_v/G_{\text{max}})$ , where  $I_v$ ,  $G_v$  = current and conductance at voltage  $V$ ;  $V_r$  = reversal potential; and  $I_{\text{max}}$ ,  $G_{\text{max}}$  = current and conductance at the most positive test potential respectively.  $V_r$  was determined by measuring deactivation tail current and averaged  $-69 \pm 1$  mV for Kv3.4 and  $-51 \pm 6$  mV for Kv3.4+MiRP1,  $n=4$  for each,  $P < 0.05$ . MiRP1 co-expression shifted activation  $V_{1/2}$  to more positive potentials (Kv3.4:  $V_{1/2} = 13.3 \pm 1.3$  mV,  $n=3$ ; Kv3.4+MiRP1:  $V_{1/2} = 19.3 \pm 0.8$  mV,  $n=3$   $P < 0.05$ , Figure 4A). The slope factor was also somewhat altered ( $22.3 \pm 7.5$  mV, Kv3.4;  $12.9 \pm 0.5$  mV, Kv3.4+MiRP1,  $P < 0.05$ ). Steady state inactivation was assessed with test pulses to +60 mV following 900-ms prepulses to potentials ranging from -100 mV to +40 mV. The inactivation  $V_{1/2}$  was not significantly affected by MiRP1 co-expression (Kv3.4:  $V_{1/2} = -25.3 \pm 1.6$  mV; Kv3.4/MiRP1:  $V_{1/2} = -22.7 \pm 2.7$  mV,  $n=7$  each, Figure 4A), and the slope factor was similarly unchanged ( $-4.7 \pm 0.5$  mV, Kv3.4;  $-6.2 \pm 0.5$  mV, Kv3.4+MiRP1,  $P = \text{NS}$ ). Changes in activation and inactivation voltage-dependence caused a shift of the maximum window current (as determined by the product of activation and inactivation variables) to more positive potentials and an enlargement of the voltage range for finite window current (overlap between activation and inactivation, Figure 4B).

MiRP1 coexpression also affected recovery from inactivation. The recovery time course was assessed with the paired-pulse protocol illustrated in Figure 4, bottom, and was slowed by MiRP1 co-expression. Kv3.4 recovery followed a mono-exponential time course ( $\tau = 204 \pm 123$  ms,  $n=5$ , Figure 4C). Co-expression of Kv3.4+MiRP1 resulted in recovery with a clearly distinguishable very slow phase ( $\tau = 1327 \pm 188$  ms,  $n=3$ , Figure 4D) that comprised  $39 \pm 9\%$  of overall recovery.

A characteristic property of Kv3.4 is its TEA sensitivity (10). However, Kv3.4 is more sensitive to TEA than native Purkinje cell  $I_{10}$  (6). We found that currents carried by Kv3.4 subunits expressed alone in CHO cells was inhibited by TEA

(Figure 5A) with an  $IC_{50}$  of  $60 \pm 11 \mu\text{M}$  (Hill coefficient  $n=0.41 \pm 0.15$ ) (Figure 5B). Co-expression of MiRP1 decreased Kv3.4 TEA sensitivity (Figure 5A) over 6-fold, to an  $IC_{50}$  of  $380 \pm 9 \mu\text{M}$ ,  $n=4$ ,  $P < 0.01$ ,  $n=0.85 \pm 0.23$ ) (Figure 5B).

## **V- Discussion**

We report here a new interaction between the  $\beta$ -subunit MiRP1 and a Kv3  $\alpha$ -subunit. We show that Kv3.4 and MiRP1 co-immunoprecipitate and co-localize in mammalian cells, and that co-expression with MiRP1 affects the properties of currents carried by Kv3.4 subunits.

Human Kv3.4 (HKShIIIC) was first cloned from a brainstem cDNA library (9). Kv3.4 channels play an important role in brain where they regulate the firing frequency of neurons (10). In the heart, the strong expression of Kv3.4 at both mRNA and protein levels in Purkinje fibers suggests a potentially important role in Purkinje tissue electrophysiology (8). When expressed in oocytes, Kv3.4 carries a typical transient outward A-type current that activates at high voltages, inactivates rapidly and in a voltage-dependent fashion (9), and is sensitive to TEA. The properties of Kv3.4 current that we observed in CHO cells were similar to those previously reported in oocytes, with the exception of the greater sensitivity of CHO cell Kv3.4 to TEA, as expected for currents in a mammalian cell line versus oocytes (15).

MiRP1 is the peptide product of *KCNE2*, a member of a gene family that includes *KCNE1*, the product of which (minK) encodes an essential subunit for the slow cardiac delayed-rectifier current, as well as MiRP2 and MiRP3, products of *KCNE3* and *KCNE4* genes (1). MiRP2 shares 35% identical amino acid residues with MiRP1, and has been shown to interact with Kv3.4 subunits at the biochemical and functional levels (12). MiRP2 shifts Kv3.4 subunit activation voltage-dependence substantially to more negative values and speeds recovery from inactivation, causing substantial increases in the current carried by Kv3.4 under physiological conditions. Mutations of MiRP2 are associated with periodic paralysis, apparently caused by a decreased ability of skeletal muscle cells to maintain their resting potential. We found in the present paper that MiRP1 also interacts with Kv3.4 subunits, but has somewhat different consequences from MiRP2, producing little change in voltage-dependent

properties but having large effects on the rate of development and recovery from inactivation.

MiRP1 was first cloned by Abbott et al in 1999, found to alter the current carrying properties of HERG to more resemble native  $I_{Kr}$ , and found to play an important role in stabilizing human cardiac rhythm (1). In oocytes, MiRP1 shifts HERG activation to more positive potentials, reduces current amplitude by ~40% and accelerates current deactivation (1). In HEK293 cells, MiRP1 accelerates activation, deactivation, and inactivation of HERG current, decreasing current density without altering activation voltage dependence (16). A comparison of HERG currents with or without MiRP1 co-expression in CHO cells and native  $I_{Kr}$  suggested close biophysical and pharmacological similarity between HERG alone and  $I_{Kr}$ , which was not appreciably altered by MiRP1 co-expression (15). Thus, although there is evidence that MiRP1 may play a significant role in endogenous currents carried by HERG, the precise functional role of the HERG-MiRP1 interaction, as well as its participation in cardiac arrhythmias, remains unclear.

More recent studies have shown that MiRP1 and related subunits are capable of functional interactions with a range of ion-channel  $\alpha$ -subunits (17, 18). MiRP1 co-expression slows Kv4.2 activation and inactivation rate and positively shifts their voltage-dependence in *Xenopus* oocytes (4). MiRP1 co-expression alters KvLQT1 currents, so that they show a more linear current-voltage relationship (19, 20). MiRP1's role may extend beyond the  $K^+$ -channel family, as it enhances the expression and accelerates the activation of pacemaker currents carried by HCN subunits (5).

In the present study, we found that MiRP1 co-expression strongly slows the development of, and recovery from, inactivation of Kv3.4 subunit-based channels. There is reason to believe that this interaction may play a functional role. Cardiac Purkinje fiber  $I_{to}$  in both dogs and humans has unusual features not shared by atrial or working ventricular cardiomyocyte  $I_{to}$ , particularly a substantial component with unusually slow recovery kinetics, of the order of seconds (6, 21). Furthermore, with standard 100-ms depolarizing voltage clamps human and canine Purkinje cells show a large TEA-sensitive sustained current component, which may play an important role in repolarization (6, 21). Slowly-inactivating MiRP1-Kv3.4 complexes are strong

candidates to contribute to these components, both because of their appropriate kinetic properties and because both MiRP1 and Kv3.4 are expressed at unusually high levels in cardiac Purkinje tissue (7, 8). Cardiac Purkinje  $I_{to}$  is sensitive to TEA, unlike ventricular muscle  $I_{to}$  (6, 21); however, native Purkinje  $I_{to}$  TEA sensitivity is an order of magnitude less than that of Kv3.4. MiRP1 co-expression significantly decreases the TEA sensitivity of Kv3.4, moving it towards that of Purkinje  $I_{to}$ . We would have liked to co-immunoprecipitate MiRP1 and Kv3.4 from native Purkinje tissue; however, the very small amount of protein that can be extracted from the small Purkinje fiber false tendon mass (~25 mg per heart) and the relatively low-level expression of ion-channel subunit proteins in native cardiac tissue made purifying sufficient protein extremely difficult.

Although the role of *KCNE2* mutations in several long-QT syndrome kindreds is clear (1, 3, 22), the mechanisms by which MiRP1 helps to stabilize cardiac rhythm remain unclear. Cardiac Purkinje tissue plays a privileged role in generating arrhythmogenic afterdepolarizations that are central to arrhythmia formation in the long QT syndrome (23, 24), and  $I_{to}$  plays a significant role in Purkinje cell repolarization (6). Thus, the MiRP1-Kv3.4 interaction may play a significant role in stabilizing cardiac Purkinje cell repolarization and preventing cardiac arrhythmias, analogous in some ways to the role of MiRP2 in stabilizing skeletal muscle electrophysiology and preventing its dysfunction (12).

## **VI- Acknowledgments**

The authors thank Evelyn Landry and Louis Villeneuve for excellent technical assistance, France Thériault for exacting secretarial help with the manuscript, Alvin Shrier, Bernardo Rudy and Gea-Ny Tseng for supplying MiRP1, Kv3.4 and MiRP1-*c-myc* clones respectively, and Terence Hebert for thoughtful comments on the manuscript. This work was supported by funds from the Canadian Institutes of Health Research and the Quebec Heart Foundation. Marc Pourrier was supported by a HSFC studentship award. Gernot Schram is a CIHR/Aventis postdoctoral research fellow.

## VII- Références

1. Abbott, G.W., Sesti, F., Splawski, I., Buck, M.E., Lehmann, M.H., Timothy, K.W., Keating, M.T., and Goldstein, S.A. (1999) *Cell*. **97**, 175-187
2. Pourrier, M., Schram, G., and Nattel, S. (2003) *J. Membr. Biol.* **194**, 141-152
3. Isbrandt, D., Friederich, P., Solth, A., Haverkamp, W., Ebneith, A., Borggreffe, M., Funke, H., Sauter, K., Breithardt, G., Pongs, O., and Schulze-Bahr, E. (2002) *J. Mol. Med.* **80**, 524-532
4. Zhang, M., Jiang, M., and Tseng, G.N. (2001) *Circ. Res.* **88**, 1012-1019
5. Yu, H., Wu, J., Potapova, I., Wymore, R.T., Holmes, B., Zuckerman, J., Pan, Z., Wang, H., Shi, W., Robinson, R.B., El Maghrabi, M.R., Benjamin, W., Dixon, J., McKinnon, D., Cohen, I.S., and Wymore, R. (2001) *Circ. Res.* **88**, E84-E87
6. Han, W., Wang, Z., and Nattel, S. (2000) *Am. J. Physiol (Heart Circ. Physiol.)* **279**, H466-H474
7. Pourrier, M., Zicha, S., Ehrlich, J., Han, W., and Nattel, S. (2003) *Circ. Res.* **93**: 189-191
8. Han, W., Bao, W., Wang, Z., and Nattel, S. (2002) *Circ.Res.* **91**, 790-797
9. Rudy, B., Sen, K., Vega-Saenz, D.M., Lau, D., Ried, T., and Ward, D.C. (1991) *J. Neurosci. Res.* **29**, 401-412
10. Schroter, K.H., Ruppertsberg, J.P., Wunder, F., Rettig, J., Stocker, M., and Pongs, O. (1991) *FEBS Lett.* **278**, 211-216

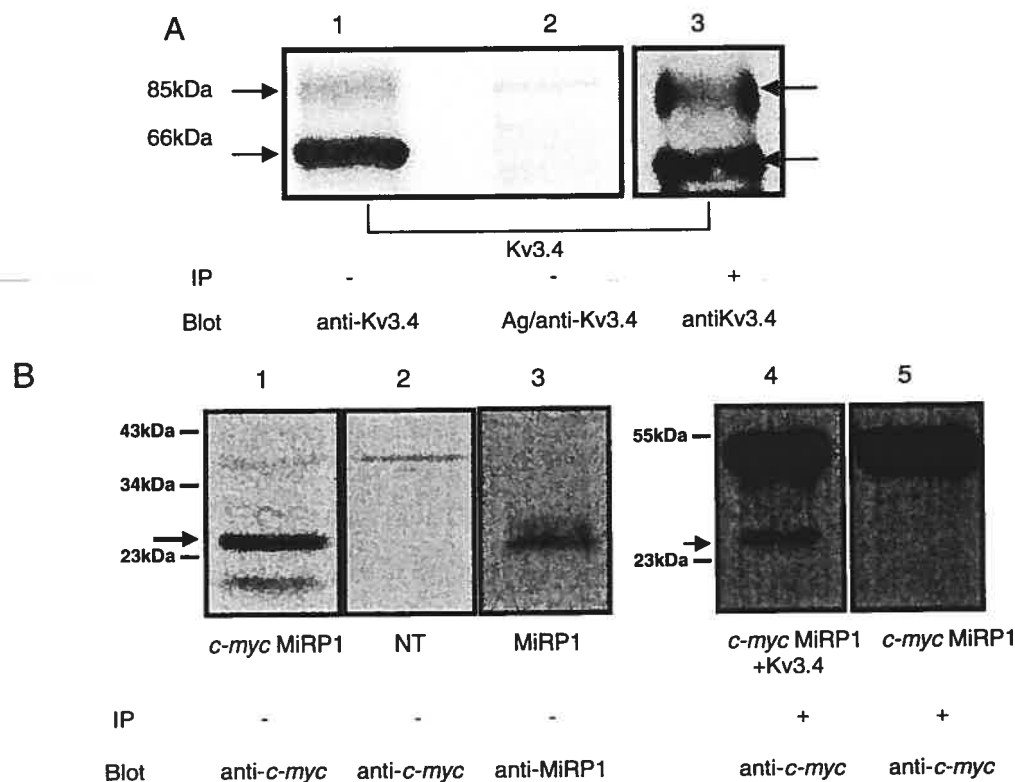


11. Shi, H., Wang, H., Lu, Y., Yang, B., and Wang, Z. (1999) *J. Membr. Biol.* **169**, 55-64
12. Abbott, G.W., Butler, M.H., Bendahhou, S., Dalakas, M.C., Ptacek, L.J., and Goldstein, S.A. (2001) *Cell* **104**, 217-231
13. Antz, C., Bauer, T., Kalbacher, H., Frank, R., Covarrubias, M., Kalbitzer, H.R., Ruppertsberg, J.P., Baukrowitz, T., and Fakler, B. (1999) *Nat. Struct. Biol.* **6**, 146-150
14. Vega-Saenz, D.M., Moreno, H., Fruhling, D., Kentros, C., and Rudy, B. (1992) *Proc. R. Soc. Lond B. Biol. Sci.* **248**, 9-18
15. Weerapura, M., Nattel, S., Chartier, D., Caballero, R., and Hebert, T.E. (2002) *J. Physiol.* **540**, 15-27
16. Mazhari, R., Greenstein, J.L., Winslow, R.L., Marban, E., and Nuss, H.B. (2001) *Circ. Res.* **89**, 33-38
17. Abbott, G.W., Goldstein, S.A.N., and Sesti, F. (2001) *Circ. Res.* **88**, 981-983
18. Abbott, G.W., and Goldstein, S.A.N. (2002) *FASEB J.* **16**, 390-400
19. Dedek, K., and Waldegger, S. (2001) *Pflugers Arch.* **442**, 896-902
20. Tinel, N., Diochot, S., Borsotto, M., Lazdunski, M., and Barhanin, J. (2000) *EMBO J.* **19**, 6326-6330
21. Han, W., Zhang, L., Schram, G., and Nattel, S. (2002) *Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol.)* **283**, H2495-H2503
22. Sesti, F., Abbott, G.W., Wei, J., Murray, K.T., Saksena, S., Schwartz, P.J., Priori, S.G., Roden, D.M., George, A.L. Jr., and Goldstein, S.A. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 10613-10618

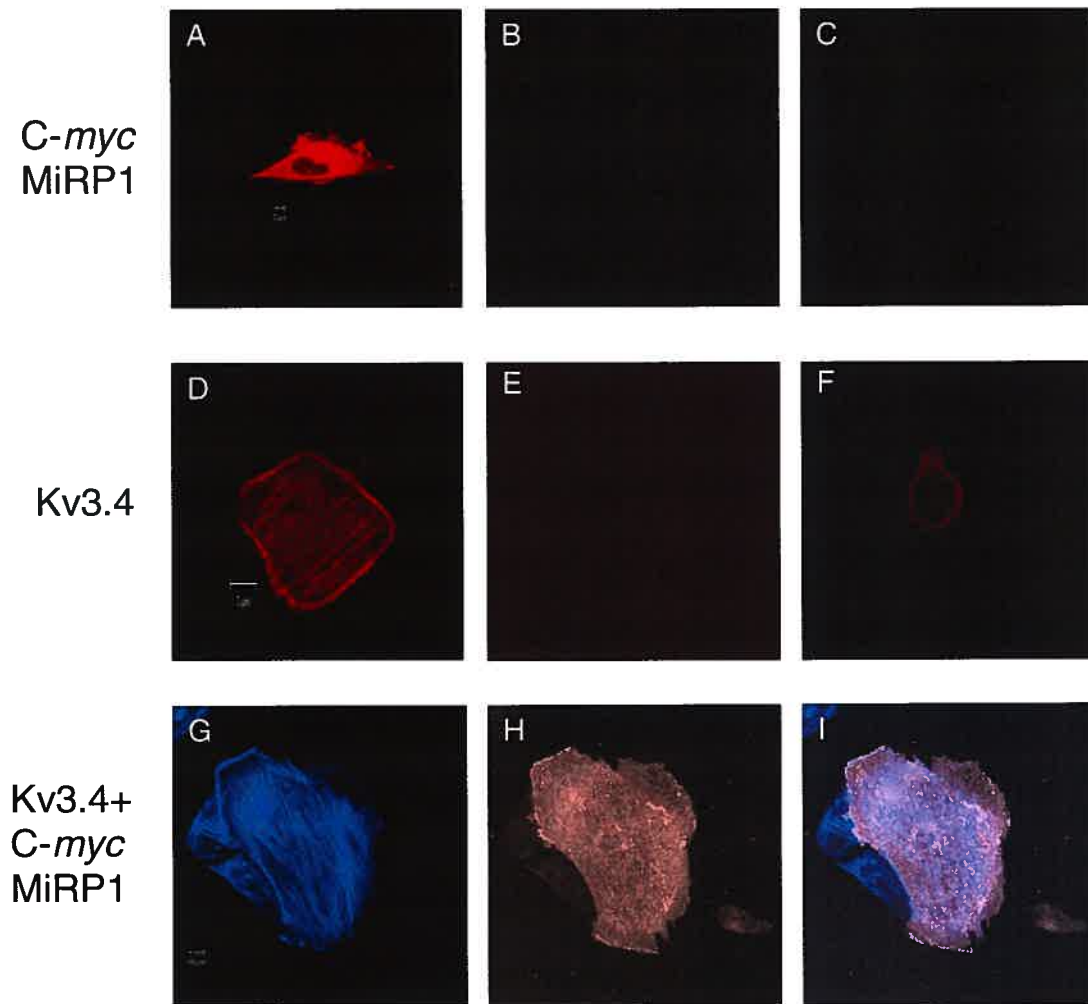
23. Nattel. S., and Quantz, M.A. (1988) *Cardiovasc. Res.* **22**, 808-817

24. El-Sherif, N., Caref, E.B., Yin, H., and Restivo, M. (1996) *Circ. Res.* **79**, 474-492

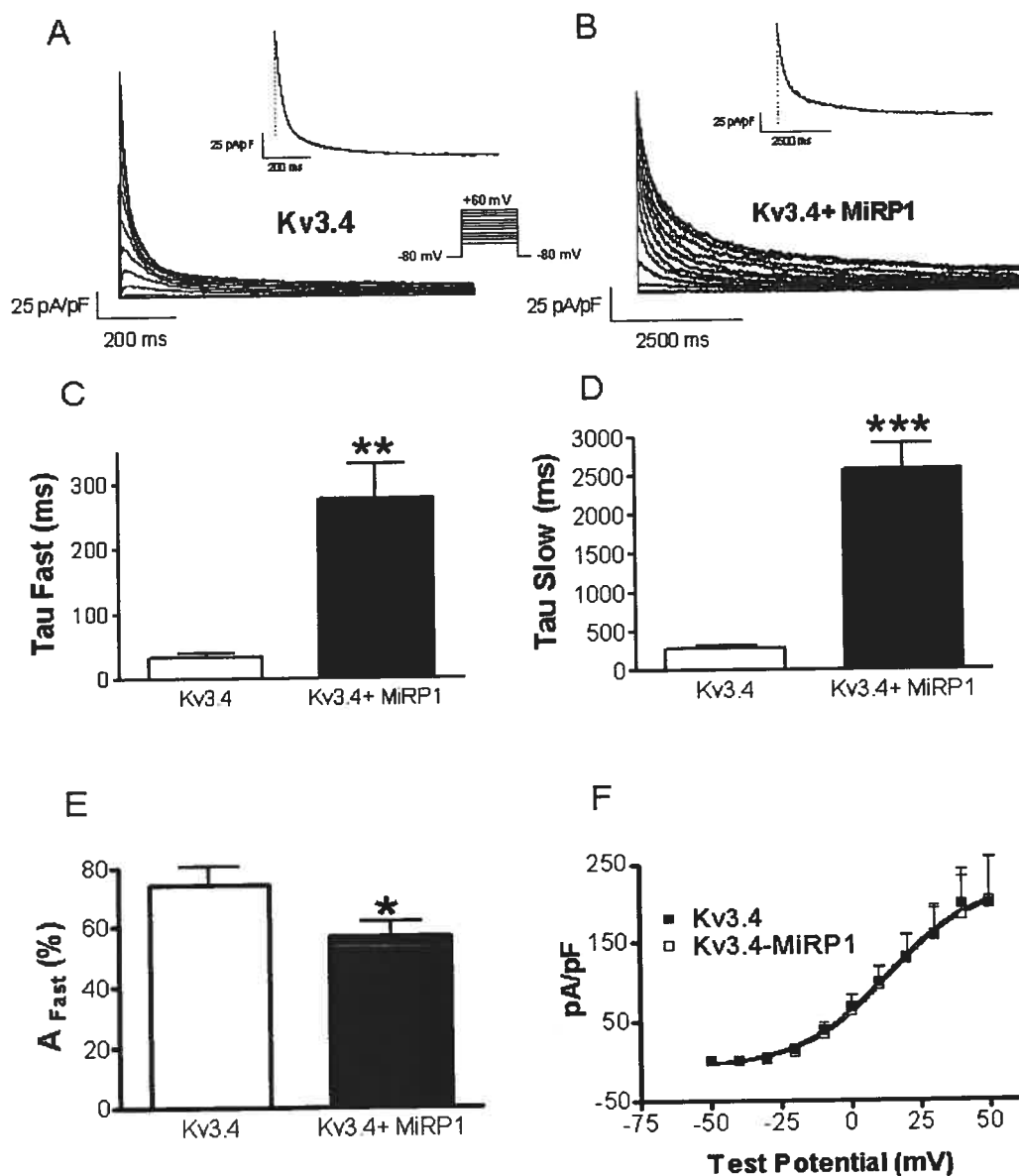
### VIII- Figures and figure legends



**Figure 1:** Co-immunoprecipitation of Kv3.4 and MiRP1. **(A)** Western blots of Kv3.4-transfected CHO cell extracts. Lane 1: bands at ~66 kDa and 85 kDa detected by blotting with anti-Kv3.4 antibody. Lane 2: a blot on the same gel with antibody pre-incubated with Kv3.4 antigenic peptide. Lane 3: immunoprecipitation of Kv3.4 by anti-Kv3.4 antibody, blotted with anti-Kv3.4. **(B)**. Lane 1: Anti-*c-myc* detected a dominant band at 25 kDa on a blot of *c-myc* MiRP1-expressing CHO cells, with a faint band at 14 kDa. Lane 2: Non-transfected cells blotted with anti-*c-myc* show no corresponding signals. Lane 3: Anti-MiRP1 detected a single band at 25 kDa in MiRP1-transfected CHO cells. Lane 4: Kv3.4/*c-myc* MiRP1 was pulled down by anti-Kv3.4 and blotted with anti-*c-myc* antibody. A MiRP1 band at ~25 kDa was detected. Lane 5: When *c-myc* MiRP1 was expressed alone in CHO cells, subjected to anti-Kv3.4 pulldown and blotting with anti-*c-myc* antibody, no MiRP1 signal was detected.

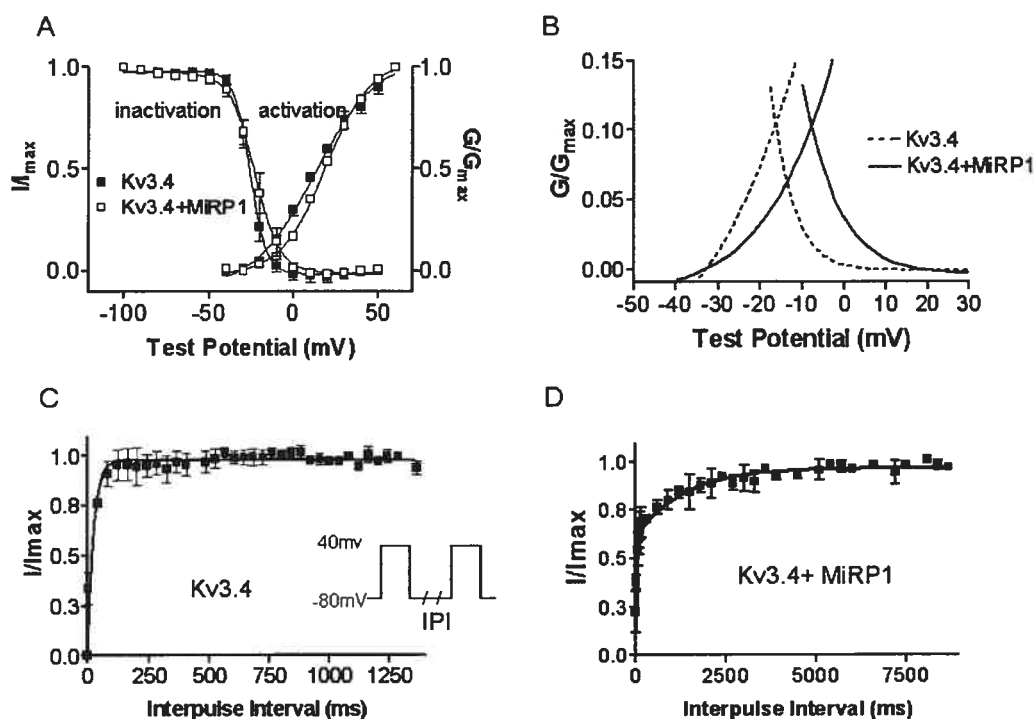


**Figure 2:** Co-localization of Kv3.4 and MiRP1 in CHO cells. Confocal microscopic image of a cell transiently transfected with *c-myc* MiRP1 alone (**A**), Kv3.4 alone (**D**) or transfected with both, with the use of different secondary antibodies showing Kv3.4 in blue (**G**) and *c-myc* MiRP1 in pink (**H**). Purple color indicates colocalization (**I**). When anti-*c-myc* antibody was applied to non-transfected cells (**C**), no signal was seen. Cells incubated with anti-Kv3.4 antibody pre-incubated with antigenic peptide showed no signal (**F**). Primary antibody was omitted and cells were incubated with only the secondary antibody for MiRP1 in (**B**) and Kv3.4 in (**E**).



**Figure 3:** Representative currents recorded from CHO cells transfected with Kv3.4 alone (A) or Kv3.4+MiRP1 (B). Recordings were obtained during a 900 ms pulse for Kv3.4 alone and a 7.5-s pulse (to resolve the slower inactivation kinetics) for Kv3.4+MiRP1, from a holding potential of -80 mV to voltages between -40 and +60 mV. Inactivation time courses were well-fit by the double-exponential relations

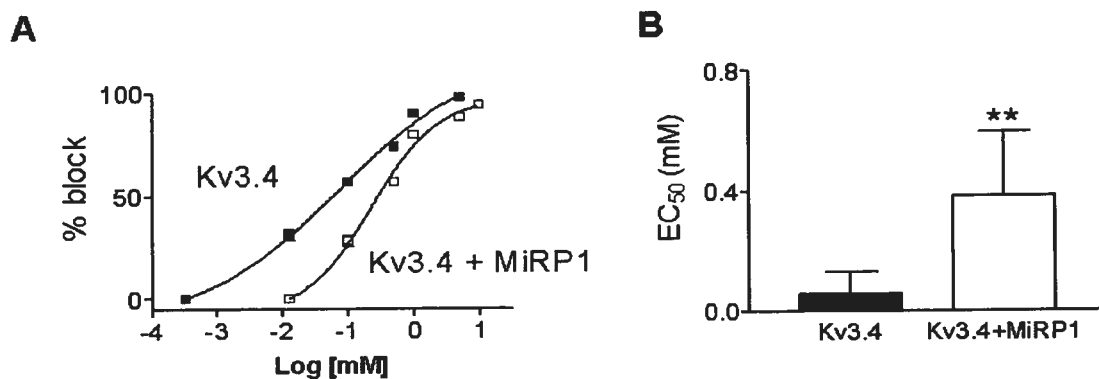
shown in insets. Fast (**C**) and slow (**D**) components of inactivation ( $\tau_{\text{fast}}$ ,  $\tau_{\text{slow}}$ ) of Kv3.4 alone and Kv3.4 co-expressed with MiRP1 at +40 mV. (**E**) Proportion of the fast phase inactivation. (**F**) Peak current-voltage relationship for cells expressing Kv3.4 alone (n=5) and Kv3.4+MiRP1 (n=6).



**Figure 4:** (A) Voltage dependence of activation and inactivation. Inactivation: Currents were elicited with a 900-ms prepulse to various conditioning potentials, followed by a test pulse to +60 mV. Values at each prepulse potential ( $I$ ) were normalized to values with a prepulse to -100 mV ( $I_{max}$ ). Symbols are mean $\pm$ SEM data and curves are best-fit Boltzmanns to the relation:  $I/I_{max} = 1 / \{1 + \exp[(V_{1/2}-V)/k]\}$  where  $V_{1/2}$ = half maximal inactivation voltage and  $k$ = slope factor ( $n=5, 7$  for Kv3.4, Kv3.4+MiRP1). Activation: Voltage-dependence was obtained based on the protocol shown in Figure 3, with conductance ( $G$ ) at each voltage given by  $G_{tp} = I_{tp} / [V_{tp} - V_R]$ , where  $I_{tp}$ = current at voltage  $V_{tp}$  and  $V_R$ = reversal potential ( $n=3, 3$  for Kv3.4, Kv3.4+MiRP1). (B) Calculated mean  $G/G_{max}$  curves based on activation and inactivation variables, showing the window current region based on the overlap. (C, D) Recovery from inactivation: the test-pulse current to conditioning-pulse current ratio ( $I/I_{max}$ ) was plotted as a function of inter-pulse interval. Symbols are mean $\pm$ SEM experimental data and curves are single-exponential fits. (C) A 400-ms conditioning

pulse from -80 mV to +40 mV was followed by an identical test pulse at inter-pulse intervals of 2-1522 ms to test Kv3.4 recovery kinetics (n=5 cells). **(D)** The conditioning pulse duration was increased to 1 s for Kv3.4-MiRP1, followed by inter-pulse intervals of 10-9610 ms, to ensure full recovery at the slower rates of the co-expressed constructs (n=3 cells).





**Figure 5:** (A) Concentration-response data (mean±SEM) for TEA effects on Kv3.4 alone and Kv3.4+MiRP1. Curves are best fits to the equation  $Y=1/\{1+(IC_{50}/X)^n\}$  where Y is the fractional block at concentration X,  $IC_{50}$  is the concentration that produces half-maximal block and n is the Hill coefficient. (B) Mean±SEM  $IC_{50}$  of TEA for Kv3.4 and Kv3.4+MiRP1 (results were obtained with 4, 4 cells for Kv3.4 and Kv3.4-MiRP1; \*\*P<0.01).

**CHAPITRE VI: KVLQT1 MODULATES THE  
DISTRIBUTION AND BIOPHYSICAL  
PROPERTIES OF HERG: A NOVEL ALPHA-  
SUBUNIT INTERACTION BETWEEN DELAYED-  
RECTIFIER CURRENTS**

Ce manuscrit a été publié dans la revue *Journal of Biological Chemistry*, 2004; 279:  
1233-1241.

# **KvLQT1 Modulates the Distribution and Biophysical Properties of HERG: A Novel Alpha-subunit Interaction Between Delayed-rectifier Currents**

**Joachim R. Ehrlich\*, Marc Pourrier\*, Manjula Weerapura†, Nathalie Ethier, Maya Marmabachi, Terence E. Hébert, Stanley Nattel**

**Running Title:** HERG-KvLQT1 interaction

\*Both authors contributed equally to the work.

†Current Address, Department of Physiology, University of Toronto.

Research Center, Montreal Heart Institute, Departments of Medicine (JRE, SN, NE, MM), Anesthesiology (TEH) and Pharmacology (MP, SN), University of Montreal and Department of Pharmacology and Therapeutics (MW, SN, TEH), McGill University.

Correspondence to Stanley Nattel, MD, Montreal Heart Institute, Research Center, 5000 Belanger Street East, Montreal, Quebec, H1T 1C8, Canada.

Telephone: 514-376-3330; Fax: 514-376-1355; XXXXXXXXXX

## **I- Summary**

Cardiac repolarization is under joint control of the slow ( $I_{Ks}$ ) and rapid ( $I_{Kr}$ ) delayed-rectifier currents. Experimental and clinical evidence indicates important functional interactions between these components. We hypothesized that there might be more direct interactions between the KvLQT1 and HERG  $\alpha$ -subunits of  $I_{Ks}$  and  $I_{Kr}$ , and tested this notion with a combination of biophysical and biochemical techniques. Co-expression of KvLQT1 with HERG in a mammalian expression system significantly accelerated HERG-current deactivation at physiologically relevant potentials by increasing the contribution of the fast component (e.g., upon repolarization from +20 mV to -50 mV: from  $20\pm 3\%$  to  $32\pm 5\%$ ,  $P < 0.05$ ), making HERG-current more like native  $I_{Kr}$ . In addition, HERG-current density was approximately doubled (e.g. tail current after a step to +10 mV:  $18\pm 3$  versus  $39\pm 7$  pA/pF,  $P < 0.01$ ) by co-expression with KvLQT1. KvLQT1 co-expression also increased the membrane immunolocalization of HERG by  $\sim 2$ -fold ( $P < 0.05$ ). HERG and KvLQT1 co-immunolocalized in canine ventricular myocytes and co-immunoprecipitated in cultured CHO cells, as well as in native cardiac tissue, indicating physical interactions between HERG and KvLQT1 proteins *in vitro* and *in vivo*. Protein interaction assays also demonstrated binding of KvLQT1 (but not another  $K^+$ -channel  $\alpha$ -subunit, Kv3.4) to a C-terminal HERG GST fusion protein. Co-expression with HERG did not affect the membrane localization or ionic current properties of KvLQT1. This study shows that the  $\alpha$ -subunit of  $I_{Ks}$  can interact with and modify the localization and current-carrying properties of the  $\alpha$ -subunit of  $I_{Kr}$ , providing potentially novel insights into the molecular function of the delayed-rectifier current system.

## II- introduction

The delayed-rectifier  $K^+$ -current,  $I_K$ , is crucial for termination of the cardiac action potential. Following the classical description of  $I_K$  by Noble and Tsien (1), there was considerable debate as to whether  $I_K$  consisted of one or two components.  $I_K$  was for a while considered to be a single current with more than one kinetic component.(2) It then became clear that  $I_K$  is composed of two distinct components, rapidly-activating  $I_{Kr}$  and more slowly-developing  $I_{Ks}$ .(3)  $I_{Ks}$  is formed by the co-assembly of  $\alpha$  (KvLQT1) and  $\beta$  (minK) subunits.(4;5) The *human ether a-go-go related gene* (*HERG*) product constitutes the  $I_{Kr}$   $\alpha$ -subunit (6) and the *KCNE2* gene product minK related peptide 1 (MiRP1) may contribute to  $I_{Kr}$  as a  $\beta$ -subunit (7), although the specific contribution of MiRP1 to native  $I_{Kr}$  is still controversial.(8) MiRP1 expression is rather sparse in ventricular tissue.(9) Deactivation of native  $I_{Kr}$  outward current is faster than deactivation of the current carried in CHO cells by HERG, with or without MiRP1, because of a larger proportion in the fast phase.(10) Mutations in genes encoding KvLQT1 (*KCNQ1*), minK (*KCNE1*) and HERG (*KCNH2*) cause distinct congenital long QT syndromes (11-13), but the clinical initiators of long QT syndromes due to  $I_{Ks}$  and  $I_{Kr}$  deficiency, in particular adrenergic stimulation, show considerable overlap. In addition,  $I_{Kr}$  and  $I_{Ks}$  share some behaviours, such as susceptibility to suppression in native systems by cell-isolating enzymes.(14)

There is evidence of functional interaction between  $I_{Kr}$  and  $I_{Ks}$ : when  $I_{Kr}$  is reduced, the action potential is prolonged, causing  $I_{Ks}$  activation to increase so as to prevent excess repolarization delay.(15;16) The present study was designed to determine whether molecular interactions exist between the corresponding  $\alpha$ -subunits, HERG and KvLQT1. Specifically, we sought to determine 1) whether co-expression of KvLQT1 with HERG produces currents different from those resulting from HERG or KvLQT1/minK expression alone and if so, 2) whether there is evidence of physical interactions between HERG and KvLQT1 proteins.

### **III- Experimental procedures**

#### **III-1 Cell Culture**

Chinese hamster ovary (CHO) cells (ATCC) were cultured at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in F12 medium (GIBCO) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Bio-Media) and 100 U/ml penicillin/ 100 µg/ml streptomycin (GIBCO). Transient transfection into CHO cells was performed with Lipofectamine-plus (Invitrogen) with HERG (0.5 µg cDNA subcloned into pcDNA3) and/or simultaneously transfected KvLQT1 (1 µg, subcloned into pCEP4). Cells were studied by patch-clamp or immunofluorescence 24-48 hours after transfection. cDNA for GFP (0.1 µg) served as transfection marker. In addition, KvLQT1 (1 µg cDNA) and minK (0.5 µg cDNA) were transiently transfected with or without HERG (0.5 µg cDNA). When used for negative control experiments, 0.5 µg Kv3.4 cDNA (pcDNA3) was transfected.

#### **III-2 Data Acquisition and Analysis**

Currents were recorded with whole-cell patch-clamp at 36±0.5°C (TC-324B temperature controller, Warner Instruments) with an Axopatch 200B amplifier and pClamp software (version 7, Axon Instruments). Borosilicate glass electrodes had 1.5-3 MΩ tip resistances when filled with internal solution. Cells had mean capacitances of 22±2 pF, with no significant differences between cells transfected with only one construct and co-transfected cells. Junction potentials averaged 11.8±0.9 mV. No voltage compensation for junction potentials was made.

The extracellular solution contained (mM) NaCl 136, KCl 5.4, MgCl<sub>2</sub> 1, CaCl<sub>2</sub> 1, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.33, HEPES 5 and dextrose 10 (pH 7.35 with NaOH). Internal solution for current recordings contained (mM) K-aspartate 110, KCl 20, MgCl<sub>2</sub> 1, MgATP 5, GTP (lithium salt) 0.1, HEPES 10, Na-phosphocreatine 5 and EGTA 5.0 (pH 7.3 with KOH).

Currents were recorded with 2-s test pulses from a holding potential (HP) of -80 mV and an inter-pulse interval of 12 s, with deactivation observed during 2- or 4-

second repolarizations to -50 mV. Voltage-dependence of HERG current ( $I_{\text{HERG}}$ ) deactivation was assessed with 400-ms pulses to +40 mV followed by 2-second repolarizations to voltages between -140 and 0 mV. The current-voltage relationship of inactivation-free  $I_{\text{HERG}}$  was evaluated by following a 500-ms activating step to +40 mV with a 25-ms pulse to -110 mV and then by 500-ms test pulses to potentials between -80 and +10 mV. Steady-state  $I_{\text{HERG}}$  inactivation was assessed with 500-ms pulses to +40 for 500 ms followed by 25-ms steps to between -140 mV and 0 mV and then by 500-ms depolarizations to +40 mV.(17)

Clampfit (Axon Instruments) and GraphPad Prism V3.0 were used for data analysis. Data are presented as mean $\pm$ SEM. A two-tailed  $P < 0.05$  by Student's  $t$ -test was considered statistically significant.

### III-3 Tissue and Cardiomyocyte Isolation

Adult mongrel dogs weighing 27 to 32 kg were anesthetized (pentobarbital 30 mg/kg iv) and artificially ventilated. Hearts were excised through a left thoracotomy and left ventricular tissue was snap-frozen in liquid nitrogen for subsequent immunoprecipitation studies. Left ventricular cardiomyocytes were isolated via coronary artery perfusion as previously described (18) for immunofluorescent studies.

### III- 4 Immunoprecipitation

CHO cells were maintained and transfected in 75 cm<sup>2</sup> flasks (Sarstedt) with ~10  $\mu$ g of cDNA (HERG or HERG plus KvLQT1) with Lipofectamine-Plus (Invitrogen). Cells were washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) 48 hours post-transfection and resuspended in lysis buffer (5 mM Tris pH 7.4, 2 mM EDTA, 5 mg/ml trypsin inhibitor, 0.1 mg/ml benzamidine and 0.43 mg/ml leupeptin). After homogenization by Polytron (2 $\times$ 10 second bursts) and centrifugation, pellets were resuspended in solubilization buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 5 mg/ml trypsin inhibitor, 0.1 mg/ml benzamidine and 0.43 mg/ml leupeptin). The lysates were pre-cleared by incubation with 50  $\mu$ L protein-G agarose beads overnight at 4°C. After centrifugation

(20 seconds, 13000 rpm) to remove beads, 8  $\mu$ g anti-KvLQT1 antibody (Alomone) was added to the supernatant, which was then incubated for 4 hours at 4°C. Protein-G agarose beads (50  $\mu$ L) were then added and immunoprecipitates washed and eluted into SDS-PAGE sample buffer. Samples were analyzed on 7.5% SDS-PAGE gels. Proteins were transferred to PVDF membranes and blotted with anti-ERG1 antibody (Alomone, 1/200 dilution). Bands were visualized with chemiluminescence imaging (Western Lightning, Perkin-Elmer Life Sciences).

### **III-5 Immunofluorescence and Confocal Microscopy**

For immunofluorescent studies, transiently transfected CHO cells were grown on sterile glass coverslips for 24 hours. Cells were then fixed (20 minutes) with 2% paraformaldehyde (Sigma), washed 3 times (5 minutes) with PBS and then blocked with 5% donkey serum (Jackson), 5% bovine serum albumin (BSA, Sigma) and permeabilized with 0.2% Triton X-100 (Sigma) for 1 hour. Cells were incubated overnight (4°C) with primary antibodies (Chemicon anti-ERG1 raised in rabbits, Santa Cruz anti-KvLQT1 raised in goats) at 1:200 dilution, followed by 3 5-minute washes with PBS and 1-hour incubation with secondary antibodies (anti-goat IgG labelled with fluorescent isothiocyanate [FITC] for KvLQT1 and anti-rabbit IgG with tetra-methyl-rhodamine-isothiocyanate [TRITC] for HERG). Confocal microscopy was performed with a Zeiss LSM-510 system. TRITC (red) and FITC (green) were excited at 543 and 488 nm with HeNe and Ar Lasers respectively, emitting fluorescence at 566 and 525 nm. For immunofluorescent studies of native myocytes, the KvLQT1 antibody raised in rabbits was obtained from Alomone and anti-HERG raised in goats from Santa Cruz Biochemicals. Secondary antibodies for myocyte studies were anti-rabbit Cy5-conjugated IgG for KvLQT1 and anti-goat FITC-conjugated IgG for HERG. Cy5 was excited with a HeNe laser at 633 nm, emitted fluorescence at 674 nm and is represented in red. Blocking conditions were optimized with 2% donkey serum and 0.2% Triton X-100.

For deconvolution, the three-dimensional image data was transferred to an AZ-10 workstation (Azunis Technologies) and images were processed with Huygens Pro software (Bitplane) with a maximum likelihood estimation (MLE) algorithm for



deconvolution (20 iterations) running on LINUX RedHat. Deconvoluted Z-stacks were transferred back into LSM-510 software for 3-D reconstruction. Control experiments omitting primary antibodies revealed absent or very low-level background staining. Experiments with primary antibodies on non-transfected mammalian cells indicated no non-specific staining.

### III-6 Creation of GST-C-terminal HERG Fusion Protein

Overlap extension technique was used to create a fusion protein with glutathione *S*-transferase (GST) and the 478 C-terminal HERG amino acid residues.

Primers were:

5'-TCAGGATCCCGGGAGTTCATCCGCTTCCAC-3' (sense) and  
5'AGTGAATTCCTAACTGCCCGGTCCGAGCC-3' (antisense).

HERG (gene bank accession number: NP 000229) in a pSP64 vector served as a template and the PCR product was subcloned into a pGEX vector containing GST sequence. PCR products were verified by restriction analysis and sequencing.

### III-7 Protein Purification and GST Pulldown

GST and GST-fusion proteins were grown in *E. coli* strain BL-21 and immobilized on Glutathione Sepharose beads (Amersham Biosciences). Protein purification was verified with Coomassie staining of SDS gels. Solubilized proteins (KvLQT1 and Kv3.4) were pre-cleared with 20  $\mu$ g GST-beads for 1 hour (4°C) as previously described.<sup>(17)</sup> After centrifugation at 3000 rpm for 1 minute, supernatants were mixed with 25  $\mu$ g GST-C-terminal HERG-fusion protein and kept on a rocking platform for 2 hours (4°C). Beads were then collected by centrifugation and washed 2 $\times$  with suspension buffer (150 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl pH7.5, protease inhibitors as above) and then fractionated on 7.5% SDS gels.

## IV- Results

### IV-1 Electrophysiological Evidence for HERG-KvLQT1 Interaction

Figures 1A and B show currents recorded from cells expressing HERG without and with KvLQT1 co-transfection. KvLQT1 transfection alone with the same quantity (1  $\mu$ g) of cDNA produced negligible current (Fig. 1C). Transfection of a larger quantity of KvLQT1 cDNA produced a small, rapidly activating and inactivating current (Fig. 1D), as described for that carried by the  $\alpha$ -subunit alone.(19;20)  $I_{\text{HERG}}$  deactivation time-constants upon repolarization to -50 mV after a 2-sec step to +20 mV were smaller in cells co-transfected with HERG+KvLQT1 (168 $\pm$ 23 and 1181 $\pm$ 140 ms, n=8) versus those with HERG alone (247 $\pm$ 38 ms and 1983 $\pm$ 390 ms, respectively, n=12, Fig. 1E). The proportion of fast-phase deactivation was greater in co-transfected cells (32 $\pm$ 5%) compared to cells expressing HERG alone (Fig. 1F, 20 $\pm$ 3%,  $P$ <0.05). There was no difference in the voltage dependence of activation of cells expressing HERG alone or co-expressed with KvLQT1 ( $V_{1/2}$  -18 $\pm$ 2 versus -17 $\pm$ 2 mV, n=15 and 14, respectively,  $P$ =n.s., Fig. 1G) and reversal potentials ( $E_{\text{rev}}$ ) were unaltered by co-expression of KvLQT1. Mean  $E_{\text{rev}}$  was -72.6 $\pm$ 1.0 mV for HERG+KvLQT1 vs. -72.8 $\pm$ 1.2 mV for HERG alone (n=8 each,  $P$ =n.s.).

Co-transfection of KvLQT1 increased HERG-current ( $I_{\text{HERG}}$ ) densities. Tail (Fig. 2A) and step (Fig. 2B)  $I_{\text{HERG}}$  densities were significantly larger in co-transfected cells. Deactivating  $I_{\text{HERG}}$  was significantly larger over a wide voltage range (Fig. 2C), as was inactivation-free current (Fig. 2D), for cells co-transfected with KvLQT1. Inactivation time-constants were similar in both groups (e.g. at +10 mV: 2.9 $\pm$ 0.3 versus 2.9 $\pm$ 0.6 ms for HERG and HERG+KvLQT1 cells, respectively, n=8 cells each,  $P$ =NS). No differences in steady-state inactivation voltage-dependencies were observed ( $V_{1/2}$  -86 $\pm$ 10 for HERG versus -82 $\pm$ 18 mV for HERG+KvLQT1,  $P$ =NS).

#### IV-2 Effect of HERG Co-expression on Current Carried by KvLQT1/minK

Having found that co-expression with the  $I_{Ks}$   $\alpha$ -subunit KvLQT1 affects  $I_{HERG}$ , we sought to determine whether the converse is also true, i.e. whether co-expression of HERG alters currents corresponding to  $I_{Ks}$  resulting from transient transfection with KvLQT1 and minK. Figure 3A shows currents resulting from concomitant expression of HERG, KvLQT1 and minK. Upon pulsing to more negative voltages (to -10 mV or less), rapidly-activating step currents with relatively large tail currents are seen. At more positive potentials, step currents continue to increase and activate more slowly, whereas tail currents fail to increase appreciably at steps positive to +20 mV. Currents from the same cell after application of 1  $\mu$ M dofetilide to inhibit  $I_{HERG}$  are shown in Figure 3B, and have the slowly-activating, sigmoidal form with small tail currents typical of  $I_{Ks}$ . We found that some run-down of KvLQT1/minK currents tended to occur during the time required for baseline recording and dofetilide exposure prior to repeated recording. In order to compare directly currents carried by KvLQT1/minK in the absence with those in the presence of HERG, we compared currents in the continuous presence of 1  $\mu$ M dofetilide in the bath, with identical recording protocols at the same time after formation of the whole-cell configuration. Figures 3C and D show representative recordings of KvLQT1/minK currents recorded with this approach in the absence and presence of HERG co-transfection. Co-expression of HERG did not affect the density of step (Fig. 3E) or tail (Fig. 3F) currents, nor the activation voltage-dependence ( $V_{1/2}$   $19 \pm 4$  versus  $21 \pm 4$  mV respectively,  $n=10$  and 8 cells without and with HERG co-transfection respectively,  $P=NS$ ). Similarly, activation (Fig. 3G) and deactivation (Fig. 3H) time-constants were unaffected.

#### IV-3 Co-localization of HERG and KvLQT1

We next sought to evaluate the relative distributions of KvLQT1 and HERG proteins in native myocytes. KvLQT1 and HERG protein immunofluorescence localized to the plasma membrane and T-tubules (Figs 4A, B). Incubation with

secondary antibody alone showed no staining with either the secondary antibody used for KvLQT1 (anti-rabbit Cy5, Fig. 4C) or for HERG (anti-goat FiTC, Fig. 4D). Co-localization was indicated by the yellow staining observed in deconvoluted images of double-labeled specimens (Fig. 4E). Figure 4F demonstrates morphological properties of the same myocyte with phase contrast microscopy. Similar results were obtained in separate experiments with cells isolated from each of four dog hearts.

Figure 5 shows deconvoluted immunofluorescent images of CHO cells expressing HERG or KvLQT1, alone or in combination. Confocal imaging of transiently transfected cells expressing only HERG demonstrated a homogeneous pattern of fluorescence throughout the cytoplasm and cell membrane, sparing the nucleus (Fig. 5A). Cells co-transfected with HERG and KvLQT1 showed a clear increase in the relative intensity of the 566-nm fluorescence signal (corresponding to the secondary antibody for HERG detection) at the cell membrane (Fig. 5B). HERG immunofluorescence profiles were analyzed with linear line-scanning algorithms at three randomly chosen membrane locations in each cell ( $n=5$  cells for HERG,  $n=7$  for HERG+KvLQT1). Mean values for fluorescence intensity at the membranes on each side of the cell (Fig. 5 right column) were  $70\pm 17$  and  $77\pm 6$  relative units, respectively, for cells transfected with HERG alone versus  $129\pm 13$  and  $125\pm 10$  relative units for co-transfected cells ( $P<0.01$  for each). The mean values for cytoplasmic fluorescence determined by analyzing 200 consecutive points at three different locations per cell were not significantly different between cells expressing HERG alone or cells co-expressing HERG+KvLQT1 ( $66\pm 15$  versus  $68\pm 22$  units,  $P=NS$ ). The ratios of membrane HERG immunofluorescence intensity to cytoplasmic HERG immunofluorescence in each cell averaged  $1.27\pm 0.3$  for HERG alone and  $2.55\pm 0.5$  for HERG+KvLQT1 ( $P<0.05$ ), indicating an ~2-fold increased membrane expression of HERG in co-transfected cells. This difference is in good agreement with the extent of  $I_{HERG}$  current augmentation resulting from co-expression with KvLQT1. Figure 5C shows co-localization of HERG and KvLQT1, indicated by yellow staining, predominantly at the membrane. Figure 5D shows KvLQT1 immunofluorescence in a cell co-expressing HERG and KvLQT1. In contrast to the results with HERG, the KvLQT1 fluorescent pattern upon co-expression was not different from that seen with KvLQT1 alone (Fig. 5E). Previous studies have

suggested a primarily cytoplasmic localization of HERG protein, as this may not traffic efficiently on its own due to ER retention signals and coiled coil motifs in the C-terminus.(21) These investigators observed an intracellular localization of HERG protein very similar to our study. Our findings suggest that KvLQT1 may promote the membrane localization of HERG protein.

#### **IV-4 Co-immunoprecipitation of HERG and KvLQT1**

Having shown spatial co-localization within myocytes and CHO cells, we assessed possible physical interaction between the two  $\alpha$ -subunits. Western blot and immunoprecipitation experiments were carried out in stable HERG-expressing cells transiently transfected with KvLQT1. Immunoblot of crude membrane (CM) extracts with anti-KvLQT1 detected a band at ~75 kDa (Fig. 6A, lane 1). Blotting with anti-KvLQT1 after pull-down with anti-KvLQT1 revealed a band of identical molecular weight (~75 kDa, lane 2), as well as a strong band below the KvLQT1 signal corresponding to immunoglobulin. Immunoblotting of crude membrane lysates with anti-ERG1 revealed two specific bands at ~135 and ~155 kDa, as expected for HERG (Fig. 6B, lane 1). Immunoprecipitation of KvLQT1 with anti-KvLQT1 followed by blotting with anti-ERG1 antibody revealed bands at ~135 and ~155 kDa (lane 2), indicating co-immunoprecipitation of HERG with KvLQT1. These bands were absent when the same procedures (Western blot of crude membrane lysates and co-immunoprecipitation) were performed after pre-incubating the anti-ERG1 antibody with a specific control antigen (lanes 3 and 4 respectively). Finally, as a negative control, proteins from CHO cells transfected with KvLQT1 alone were processed as in the co-immunoprecipitation. No bands were seen upon blotting with anti-ERG1 (lane 5). Similar results were obtained in 3 separate experiments.

To determine whether HERG and KvLQT1 are physically associated in native hearts, we repeated the co-immunoprecipitation experiments in freshly frozen canine left ventricular tissue. Immunoblotting a crude left ventricular membrane extract with anti-KvLQT1 antibodies revealed a faint but distinct band at ~75 kDa (Fig. 7A, lane 1). The same band was detected following immunoprecipitation with anti-KvLQT1 (lane 2), indicating that the pulldown was effective. Figure 7B shows ~135 and ~155

kDa bands obtained by immunoblotting of crude membranes with anti-ERG1 antibody (lane 1) and their elimination after pre-incubation with the specific control antigen (lane 2). Co-immunoprecipitation with KvLQT1 (lane 3) followed by blotting with anti-ERG1 revealed similar bands at ~135 and ~155 kDa, that were eliminated by pre-incubation of the anti-ERG1 antibody with ERG1 antigen. Similar results were obtained in 3 independent experiments of each type.

#### IV-5 GST Pulldown of KvLQT1

Increased membrane trafficking of HERG protein, together with faster deactivation of  $I_{\text{HERG}}$ , hinted towards involvement of the C-terminal domain in the interaction. We used the complete C-terminus of HERG (478 AA) fused to glutathione-S-transferase (GST) for pulldown studies of KvLQT1. Kv3.4 was used as a negative control. Figure 8 shows representative results. Successful pulldown was indicated by the single band at ~75 kDa representing the KvLQT1 protein (lane 1, panel A). As solubilized protein samples (Fig. 8A, lane 3) were pre-cleared with GST-beads, we can exclude non-specific interaction between GST and KvLQT1. This is evidenced by the persistence of KvLQT1 protein (band of ~75 kDa in Fig. 8A, lane 2) after pre-clearing.

In control experiments, no interaction was observed between Kv3.4 and the C-terminal HERG-GST. Blotting of whole-cell lysates from transfected cells with anti-Kv3.4 antibody yielded two specific bands of approximately 65 and 85 kDa (Fig. 8B, lane 1), which were absent when antibody was pre-incubated with antigenic peptide (lane 2). Kv3.4 protein samples showed two bands with pre-cleared and solubilized protein (Panel C, lanes 2 and 3), but no protein interaction with C-terminal HERG-GST was detected (Fig. 8C, lane 1). In a similar fashion, GST-protein alone was unable to precipitate Kv3.4 protein (Fig. 8C, lane 4).

## **V- Discussion**

In the present study, we have demonstrated physical interactions between KvLQT1 and HERG, which were associated with increased HERG-protein membrane localization, enhanced current density and altered biophysical properties of HERG currents. On the other hand, co-expression with HERG did not alter the cellular distribution of KvLQT1 or change the density or properties of KvLQT1/minK currents.

### **V-1 Physiological Role of $I_K$ and Subunit Interactions**

$I_K$  is a key repolarizing current in the heart. Loss-of-function mutations in the subunits encoding  $I_{Kr}$  and  $I_{Ks}$  destabilize repolarization and cause potentially life-threatening arrhythmias, (22-26) as does drug-induced  $I_{Kr}$  dysfunction.(27)  $I_{Kr}$  and  $I_{Ks}$  clearly interact at a functional level.  $I_{Kr}$  inhibition causes cardiomyocytes to spend more time at positive potentials at which  $I_{Ks}$  is activated, increasing the importance of  $I_{Ks}$  in action potential repolarization and tending to prevent excessive repolarization delays.(28;29) Loss of this compensatory potential because of  $I_{Ks}$  dysfunction greatly increases the consequences of  $I_{Kr}$  inhibition and the consequent risk of excessive repolarization delay and arrhythmias.(30-32)

The present study indicates a novel potential mechanism for  $I_{Kr}$ - $I_{Ks}$  interaction: a molecular interaction between the respective  $\alpha$ -subunits HERG and KvLQT1. KvLQT1 was found to associate physically with HERG in both CHO cells and native cardiomyocytes, and to increase membrane localization of HERG in CHO cells. KvLQT1-induced increases in HERG membrane expression were paralleled by increased  $I_{HERG}$  density. In the presence of KvLQT1,  $I_{HERG}$  deactivation was accelerated, bringing its deactivation properties closer to those of native  $I_{Kr}$ .(33) The mechanism of this interaction remains to be established more fully. HERG and KvLQT1 may well not co-assemble into heterotetramers, but interact at the level of membrane trafficking, insertion, or assembly in common macromolecular complexes.

However, our data using GST pulldowns suggests that there is a direct association between KvLQT1 and the C-terminal domain of HERG. The interaction seems to be specific as Kv3.4 does not interact with the C-tail of HERG, nor does it co-immunoprecipitate with HERG (data not shown).

A variety of interactions between HERG and potential  $\beta$ -subunits have been suggested. Suppression of minK expression reduces  $I_{Kr}$  in AT1 cells and neonatal mouse cardiomyocytes,(34;35) and HERG appears to co-assemble with exogenous minK in CHO cells and in native equine cardiac tissue, affecting  $I_{HERG}$  density and gating kinetics.(36-38) MiRP1 was first described as an essential  $\beta$ -subunit for reconstitution of  $I_{Kr}$ ,(39) but understanding the role of MiRP1 has been complicated by the observations that ventricular MiRP1 expression is limited,(40) that co-expression with MiRP1 in mammalian cells does not make  $I_{HERG}$  more  $I_{Kr}$ -like,(41) and by the recent demonstration of a variety of MiRP variants endogenous to *Xenopus* oocytes with contrasting effects on  $I_{HERG}$ .(42) Interestingly, MiRP1 is believed to interact with the C-terminal region, specifically the cyclic nucleotide binding domain, of HERG.(28) To our knowledge, our study is the first to suggest interactions between the  $\alpha$ -subunits of  $I_{Kr}$  and  $I_{Ks}$  and we must consider the possibility that alternative interactions between HERG and MiRP1 or KvLQT1 may offer an explanation for some of these disparate observations in the literature.

Several other protein partners have been demonstrated to interact with the N- and C-terminal cytoplasmic tails of HERG. A number of the C-terminal interacting proteins, including GM 130 (29) and 14-3-3 isoforms (30, 31), have been identified as playing a potential role in the trafficking of HERG to the cell surface. A recent study also demonstrated that HERG can interact with  $\beta$ 1 integrin and, although not mapped *per se*, N-terminal HERG deletions could still interact with integrin, again suggesting the C-tail of HERG as the site of interaction.(32) The fact that the C-terminal of HERG has been recently demonstrated to be critical for proper membrane insertion of HERG (33, 34) also highlights the key role for this domain in HERG function. It is also known that LQT2 mutations in the C-terminal tail affect trafficking of HERG from the ER to the cell surface.(35, 36) It is thus clear that interactions between the C-terminal of HERG and several possible protein partners are important



in protein localization and channel function, and KvLQT1 may now be added to this list.

Another source of potential  $I_{\text{HERG}}$  heterogeneity is heteromeric assembly of physiologically occurring HERG splice variants. This has been suggested by the finding that an N-terminal splice variant of the human gene (HERG B, or the murine homolog mERG B) expressed in *Xenopus* oocytes, leads to current with more rapid activation and deactivation kinetics compared to canonical HERG.(43;44) It has been suggested that such splice variants might play an important role in mammalian  $I_{\text{Kr}}$ ; however, there is evidence in human and rat hearts that HERG B is not expressed at the protein level.(45) Decreased  $I_{\text{HERG}}$  amplitude, acceleration of activation and shifting of activation voltage-dependence towards more negative values occur when a C-terminal splice variant of HERG (HERG USO) is co-expressed with HERG.(46) HERG USO, for which the mRNA expression is strong in the human heart, does not carry current on its own, but significantly modifies the properties of concomitantly expressed HERG.(47) It remains to be determined if these HERG variants can also interact with KvLQT1.

Our studies were performed primarily in CHO cells. It remains to be determined whether the interactions that we observed are specific to this cell line or are seen in other systems as well. The evidence for co-localization of HERG and KvLQT1 protein in canine heart cells and our ability to co-immunoprecipitate HERG and KvLQT1 from crude left ventricular membrane preparations argue for the relevance of our observations to cardiac HERG-KvLQT1 interaction.

Like Pond et al (39), we found HERG to localize to cross-striations compatible with the T-tubular system, as well as to lateral membranes and intercalated disks. Other cardiac potassium channels such as Kir 2.1 and Kir 2.3 have also been localized to T-tubules.(41, 42) However, the function of HERG and KvLQT1 protein localization to T-tubular structures in native cardiomyocytes remains unclear, and although a very interesting issue goes well beyond the scope of the present study.

The molecular motifs involved in the HERG-KvLQT1 interaction remain to be more fully defined. Such information would be very useful in pointing to the

potential effects of mutations in HERG and KvLQT1 on the interaction, as well as in defining the potential involvement of the HERG-KvLQT1 interaction in contributing to the clinical manifestations of congenital long QT syndromes.

## **VI- Acknowledgments**

This work was supported by the Quebec Heart and Stroke Foundation and the Canadian Institutes of Health Research. JRE is a Heart and Stroke Foundation of Canada (HSFC) Research Fellow and TEH is a MacDonald Scholar of the HSFC. The authors thank Phan Trieu for assistance with co-immunoprecipitation, Louis Villeneuve for contributions to confocal imaging and analysis, Evelyn Landry for technical support and France Thériault for secretarial help with the manuscript. We are indebted to Michael Sanguinetti for providing minK, HERG and KvLQT1 cDNAs.

## VII- References

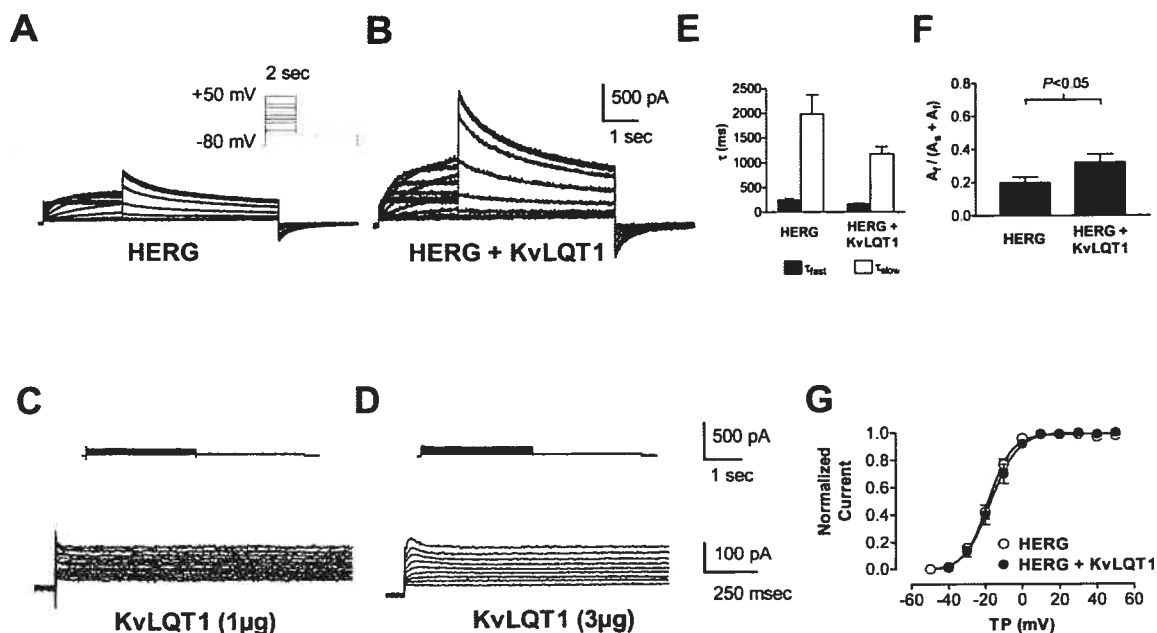
1. Noble, D., and Tsien, R. W. (1969) *J. Physiol.* **200**, 205-231
2. Matsuura, H., Ehara, T., and Imoto, Y. (1987) *Pflugers Arch.* **410**, 596-603
3. Sanguinetti, M. C. and Jurkiewicz, N. K. (1990) *J. Gen. Physiol.* **96**, 195-215
4. Sanguinetti, M. C., Curran, M. E., Zou, A., Shen, J., Spector, P. S., Atkinson, D. L., and Keating, M. T. (1996) *Nature* **384**, 80-83
5. Barhanin, J., Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Lazdunski, M., and Romey, G. (1996) *Nature* **384**, 78-80
6. Sanguinetti, M. C., Jiang, C., Curran, M. E., and Keating, M. T. (1995) *Cell* **81**, 299-307
7. Abbott, G. W., Sesti, F., Splawski, I., Buck, M. E., Lehmann, M. H., Timothy, K. W., Keating, M. T., and Goldstein, S. A. (1999) *Cell* **97**, 175-187
8. Weerapura, M., Nattel, S., Chartier, D., Caballero, R., and Hebert, T. E. (2002) *J. Physiol.* **540**, 15-27
9. Pourrier, M., Zicha, S., Ehrlich, J., Han, W., and Nattel, S. (2003) *Circ. Res.* **93**, 189-191
10. Sanguinetti, M. C., Curran, M. E., Spector, P. S., and Keating, M. T. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 2208-2212
11. Splawski, I., Tristani-Firouzi, M., Lehmann, M. H., Sanguinetti, M. C., and Keating, M. T. (1997) *Nat. Genet.* **17**, 338-340
12. Yue, L., Feng, J., Li, G. R., and Nattel, S. (1996) *Am. J. Physiol.* **270**, H2157-H2168
13. Varro, A., Balati, B., Iost, N., Takacs, J., Virag, L., Lathrop, D. A., Csaba, L., Talosi, L., and Papp, J. G. (2000) *J. Physiol.* **523** Pt 1, 67-81

14. Biliczki, P., Virag, L., Iost, N., Papp, J. G., and Varro, A. (2002) *Br. J. Pharmacol.* **137**, 361-368
15. Smith, P. L., Baukrowitz, T., and Yellen, G. (1996) *Nature* **379**, 833-836
16. Yue, L., Feng, J., Gaspo, R., Li, G. R., Wang, Z., and Nattel, S. (1997) *Circ. Res.* **81**, 512-525
17. Robillard, L., Ethier, N., Lachance, M., and Hébert, T.E. (2000) *Cell. Signal.* **12**, 673-682
18. Jenke, M., Sanchez, A., Monje, F., Stuhmer, W., Weseloh, R. M., and Pardo, L. A. (2003) *EMBO J.* **22**, 395-403
19. Nattel, S. (1999) *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **10**, 272-282
20. Zeng, J., Laurita, K. R., Rosenbaum, D. S., and Rudy, Y. (1995) *Circ. Res.* **77**, 140-152
21. Yang, T., Kupersmidt, S., and Roden, D. M. (1995) *Circ. Res.* **77**, 1246-1253
22. Kupersmidt, S., Yang, T., Anderson, M. E., Wessels, A., Niswender, K. D., Magnuson, M. A., and Roden, D. M. (1999) *Circ. Res.* **84**, 146-152
23. Finley, M. R., Li, Y., Hua, F., Lillich, J., Mitchell, K. E., Ganta, S., Gilmour, R. F., and Freeman, L. C. (2002) *Am. J. Physiol. (Heart Circ Physiol)* **283**, H126-H138
24. McDonald, T. V., Yu, Z., Ming, Z., Palma, E., Meyers, M. B., Wang, K. W., Goldstein, S. A., and Fishman, G. I. (1997) *Nature* **388**, 289-292
25. Ohyama, H., Kajita, H., Omori, K., Takumi, T., Hiramoto, N., Iwasaka, T., and Matsuda, H. (2001) *Pflugers Arch.* **442**, 329-335
26. Yu, H., Wu, J., Potapova, I., Wymore, R. T., Holmes, B., Zuckerman, J., Pan, Z., Wang, H., Shi, W., Robinson, R. B., El-Maghrabi, M. R., Benjamin, W.,

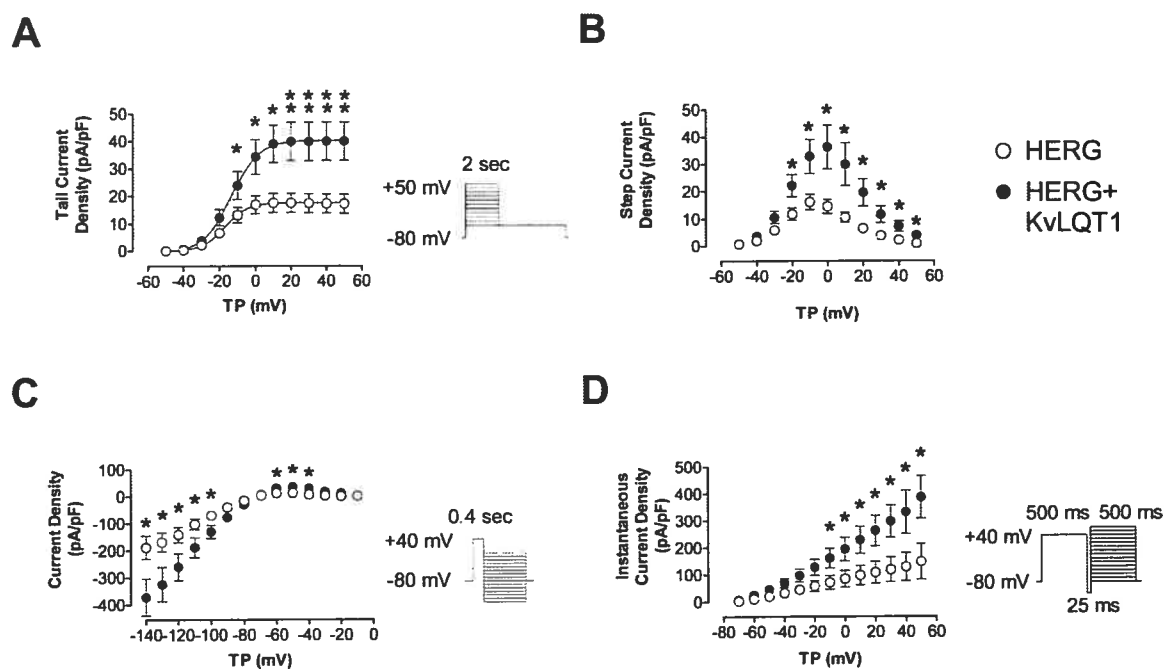
- Dixon, J., McKinnon, D., Cohen, I. S., and Wymore, R. (2001) *Circ. Res.* **88**, E84-E87
27. Anantharam, A., Lewis, A., Panaghie, G., McCrossan, Z. A., Lerner, D. J., and Abbott, G. W. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 11739-11745
28. Cui, J., Kagan, A., Qin, D., Mathew, J., Melman, Y. F., and McDonald, T.V. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 17244-17251
29. Roti, E.C., Myers, C.D., Ayers, R.A., Boatman, D.E., Delfosse, S.A., Chan, E.K., Ackerman, M.J., January, C.T., and Robertson, G.A. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 47779-47785
30. Kagan, A., Melman, Y.F., Krumerman, A., and McDonald, T.V. (2002) *EMBO J.* **21**, 1889-1898
31. O'Kelly, I., Butler, M. H., Zilberberg, N., and Goldstein S. A. N. (2002) *Cell* **111**, 577-588
32. Cherubini, A., Pillozzi, S., Hofmann, G., Crociani, O., Guasti, L., Lastraioli, E., Polvani, S., Masi, A., Becchetti, A., Wanke, E., Olivotto, M., and Arcangeli, A. (2002) *Ann. NY Acad. Sci* **973**, 559-561
33. Akhavan, A., Atanasiu, R., and Shrier, A. (2003) *J. Biol. Chem.* Papers in Press. Published on July 28, 2003 as Manuscript M307837200
34. Aydar, A., and Palmer, C. (2001) *J. Physiol.* **534**, 1-14
35. Zhou, Z., Gong, Q., Epstein, M.L., and January, C.T. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 21061-21066
36. Kupersmidt, S., Yang, T., Chanthaphaychith, S., Wang, Z., Towbin, J. A., and Roden, D. M. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 27442-27448

37. Lees-Miller, J. P., Kondo, C., Wang, L., and Duff, H. J. (1997) *Circ. Res.* **81**, 719-726
38. London, B., Trudeau, M. C., Newton, K. P., Beyer, A. K., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Satler, C. A., and Robertson, G. A. (1997) *Circ. Res.* **81**, 870-878
39. Pond, A. L., Scheve, B. K., Benedict, A. T., Petrecca, K., van Wagoner, D. R., Shrier, A., and Nerbonne, J. M. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 5997-6006
40. Kupersmidt, S., Snyder, D. J., Raes, A., and Roden, D. M. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 27231-27235
41. Clark, R.B., Tremblay, A., Melnyk, P., Allen, B.G., Giles, W.R., and Fiset, C. (2001) *J. Physiol.* **537**, 979-992
42. Melnyk, P., Zhang, L., Shrier, A., and Nattel, S. (2002) *Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol.)* **283**, H1123-H1133

### VIII- Figures and figure legends

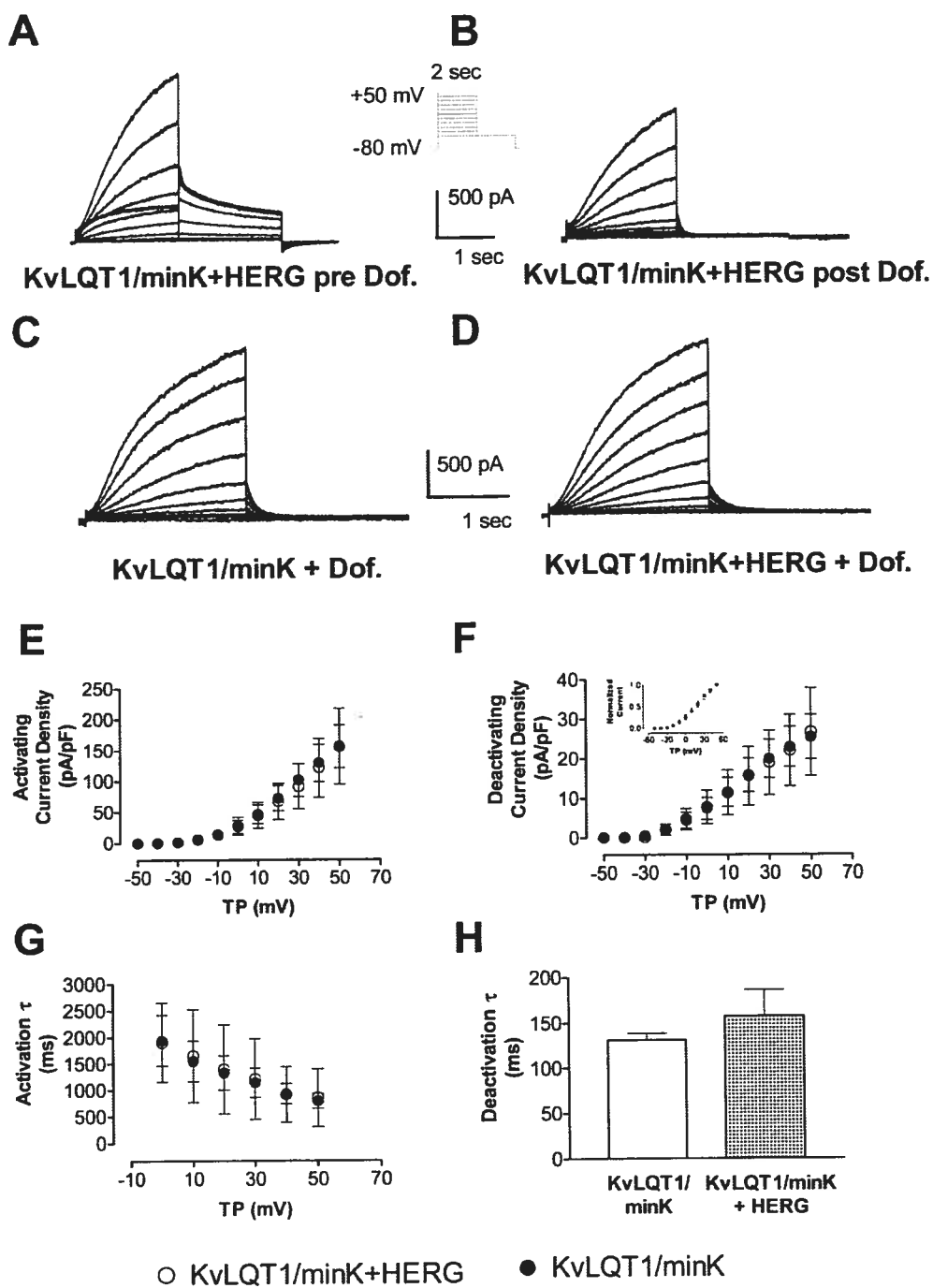


**Figure 1:** A, B: Recordings from HERG-expressing CHO cells without (A) or with (B) KvLQT1 co-transfection (voltage protocol in inset). C, D: Recording from a cell transfected with 1 (C) or 3 (D)  $\mu$ g KvLQT1 cDNA in the absence of HERG. Note the expanded time and current amplitude scales in recordings at the bottom of both panels. E: Deactivation time-constants at -50 mV ( $n=15, 14$  cells for HERG alone, HERG+KvLQT1), based on bi-exponential fits of data obtained with protocol in A. F: Relative amplitude of fast ( $A_f$ ) component of deactivation ( $A_s$ = amplitude of slower component). The changes in current characteristics were not associated with a change in voltage dependence of activation (G).

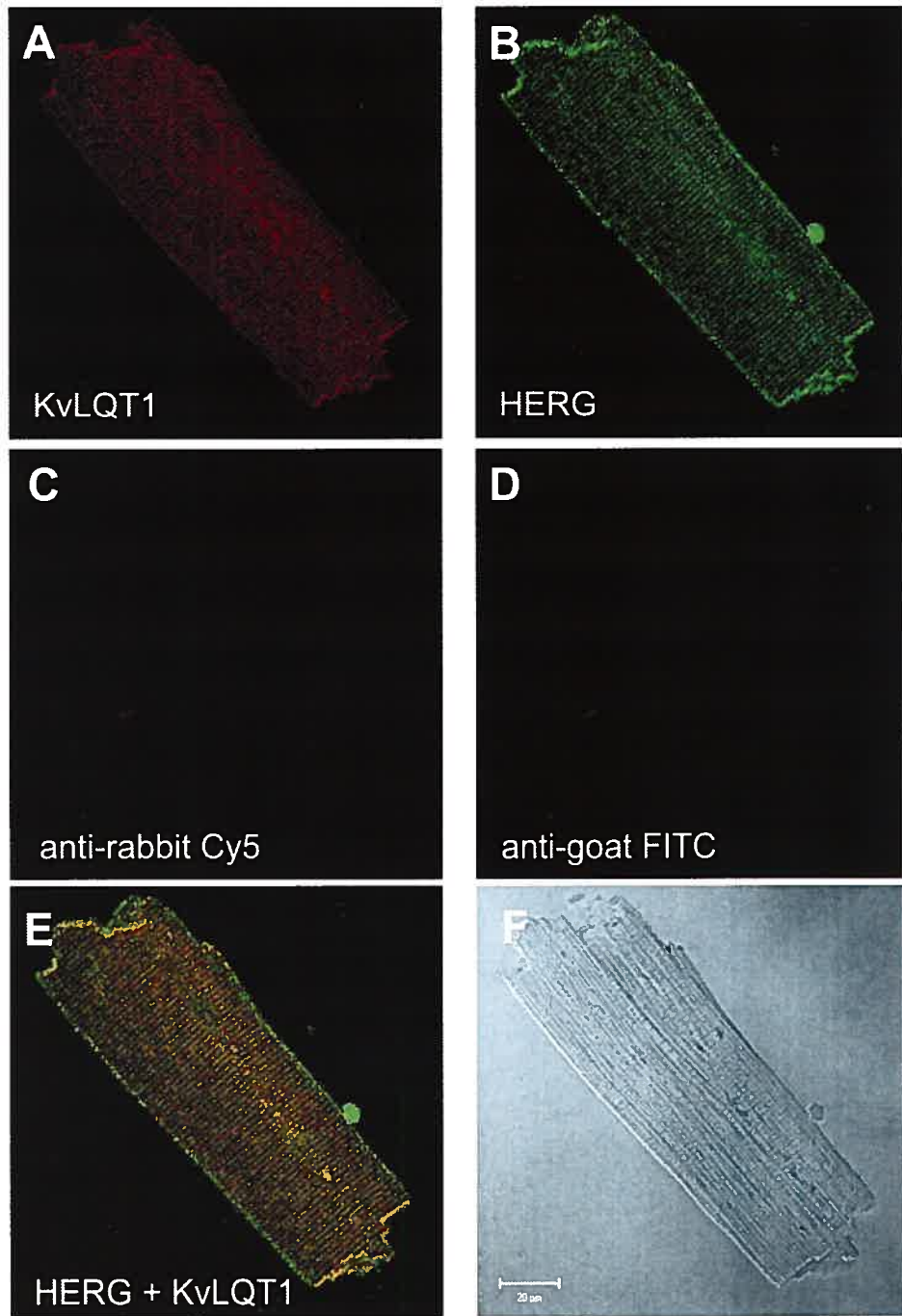


**Figure 2:** Co-transfection with KvLQT1 resulted in significantly greater mean $\pm$ SEM currents during deactivation (A) and activation (B). Fully activated tail current density (mean $\pm$ SEM) was  $\sim$ 2.3-fold greater in co-transfected cells than in those expressing HERG alone (C). Instantaneous inactivation-free current (mean $\pm$ SEM) measured immediately after the end of a short hyperpolarizing pulse (protocol shown in inset) was significantly greater in co-transfected cells (D). TP=test potential, \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01,  $n$ =15, 14 cells for HERG alone, HERG+KvLQT1.

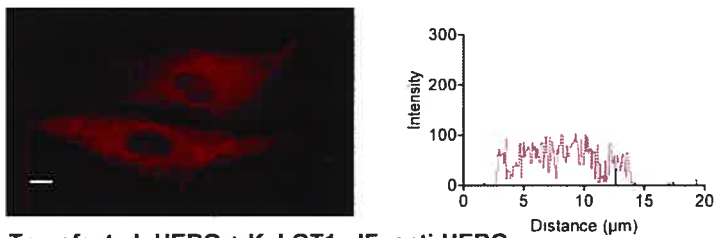
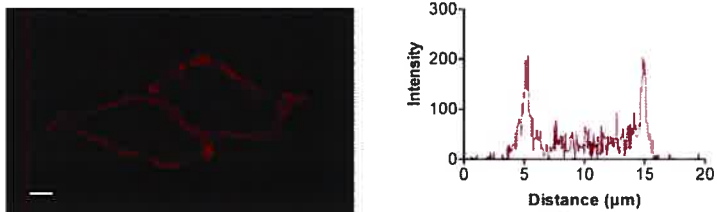
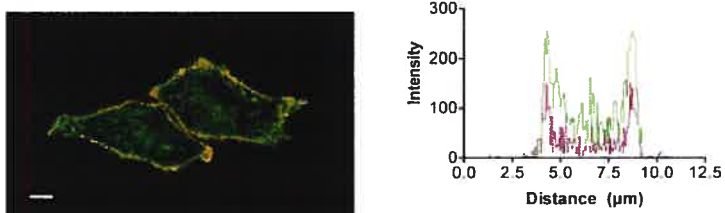
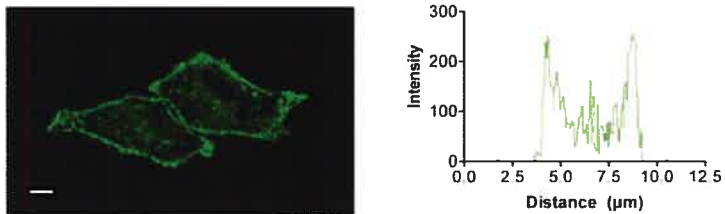
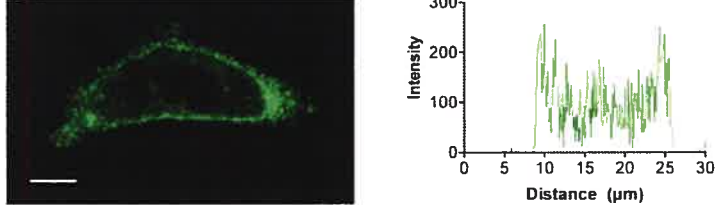




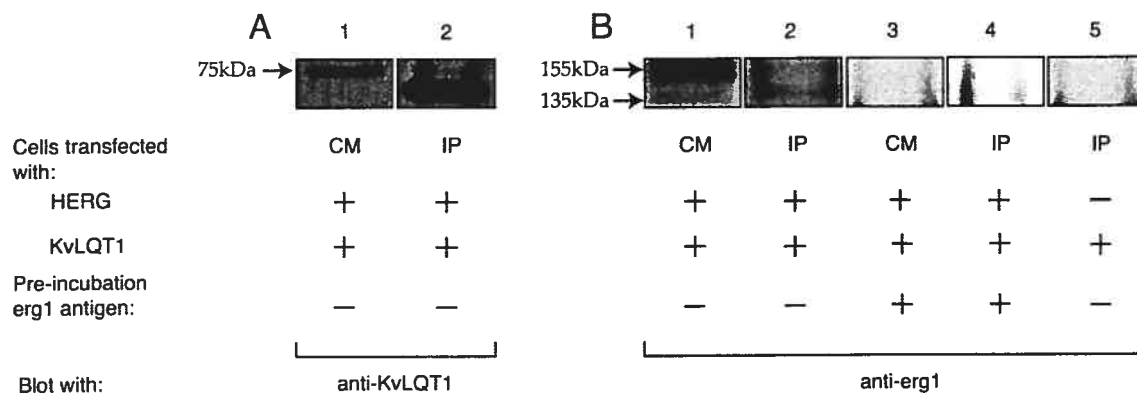
**Figure 3:** A: Current recordings (protocol in inset) from a cell transiently transfected with KvLQT1, minK and HERG. B: Recordings from the same cell after exposure to 1  $\mu$ M dofetilide. C, D. Representative currents recorded from CHO cells transiently transfected with KvLQT1/minK (C) or KvLQT1/minK+HERG (D) in the presence of 1  $\mu$ M dofetilide. Current density was similar in the presence versus absence of HERG, whether measured as mean $\pm$  relations (inset) was similarly unaltered by HERG co-transfection. There was no difference in activation (G) or deactivation (H) kinetics. N=10, 8 cells for KvLQT1/minK, HERG+KvLQT1/minK respectively.



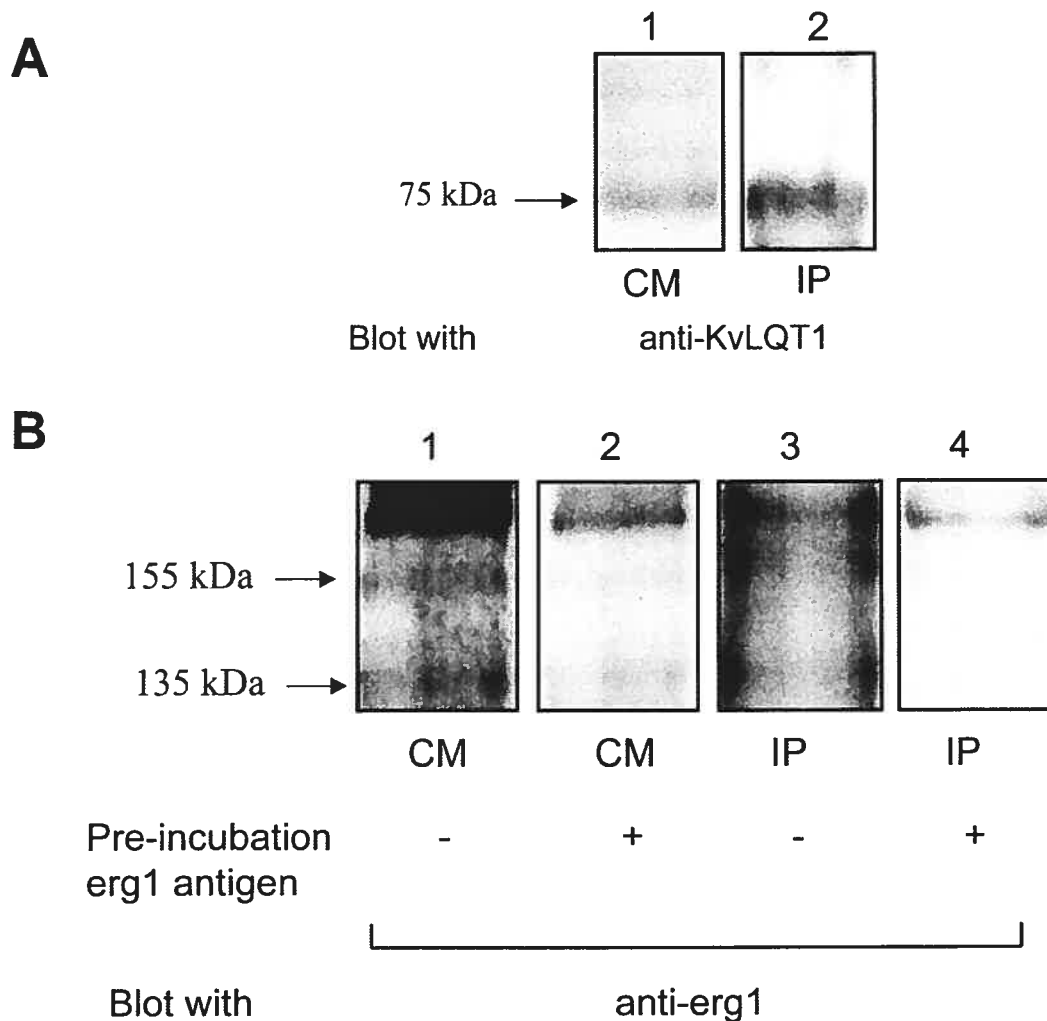
**Figure 4:** Deconvoluted immunofluorescent images of a canine ventricular myocyte double-labeled with anti-HERG and anti-KvLQT1 antibodies. A: KvLQT1 localization; B: HERG localization; C, D: control experiments with primary antibody omitted (C: anti-rabbit Cy5 antibody, secondary antibody for anti-KvLQT1; D: anti-goat FITC antibody, secondary antibody for anti-HERG). E: Co-localization is indicated by yellow coloration in the merged image (same cell as panels A, B). F: Phase-contrast microscopic image of the same cell.

**A** Transfected: HERG - IF: anti-HERG**B** Transfected: HERG + KvLQT1 - IF: anti-HERG**C** Transfected: HERG + KvLQT1 - IF: anti-HERG + anti-KvLQT1**D** Transfected: HERG + KvLQT1 - IF: anti-KvLQT1**E** Transfected: KvLQT1 - IF: anti-KvLQT1

**Figure 5:** A: Confocal microscopic image of a cell transiently transfected with HERG alone. The line-scan profile of fluorescence is shown on the right. Red color represents immunofluorescence of secondary antibody to anti-HERG. B: Immunofluorescence corresponding to HERG from a cell co-transfected with HERG and KvLQT1. Parameter settings for the laser scanning microscope were identical to those used in panel A. Note greater fluorescence at the cell membrane compared to that in panel A. C: HERG (red) and KvLQT1 (green) immunofluorescence in a cell transiently transfected with both HERG and KvLQT1. Yellow coloration indicates co-localization. D: Green KvLQT1 fluorescence signal (FITC coupled secondary antibody) only, in same cell co-transfected with HERG and KvLQT1 illustrated in panels B and C. E: KvLQT1 fluorescence from a cell transfected with KvLQT1 alone. The horizontal scales indicate 5  $\mu\text{m}$ .

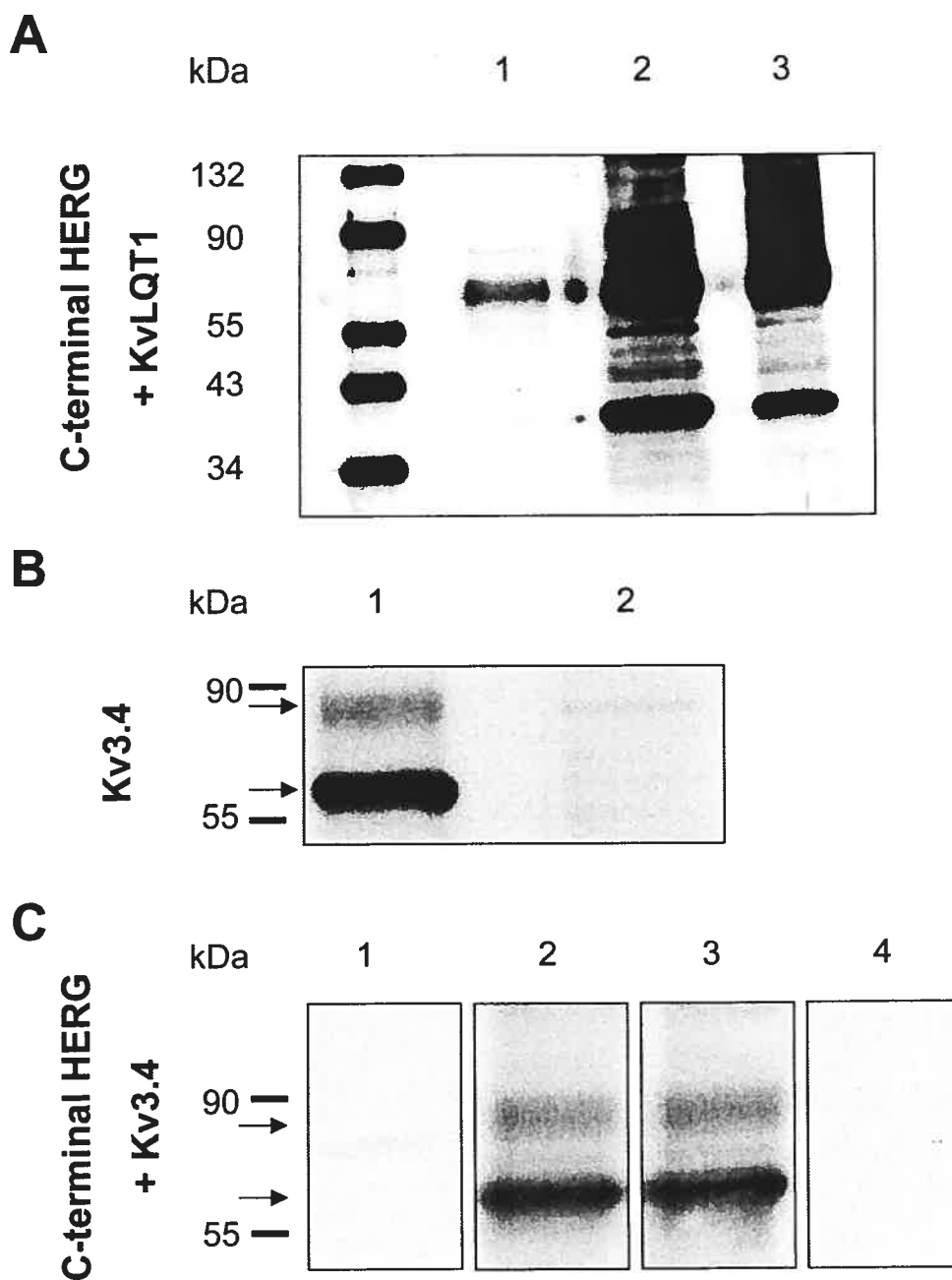


**Figure 6:** Western blots for HERG and KvLQT1 proteins in CHO cells, with and without KvLQT1 pulldown. A: Immunoblotting with anti-KvLQT1 on crude membrane fraction of cells transiently transfected with both HERG and KvLQT1 (lane 1) revealed a single band at ~75 kDa. Anti-KvLQT1 immunoblotting of a crude membrane preparation from the same cells that had been subjected to immunoprecipitation with anti-KvLQT1 (lane 2) also revealed a band at ~75 kDa, as well as a lighter molecular weight immunoglobulin band. B: Crude membrane extracts of cells transfected with HERG and KvLQT1 and immunoblotted with anti-erg1 antibody revealed bands at ~135 and 155 kDa (lane 1). Immunoprecipitation with anti-KvLQT1 followed by anti-erg1 immunoblotting showed the same bands as in lane 1. Pre-incubation of anti-erg1 with the antigenic erg1 peptide prior to immunoblotting eliminated the bands seen in lanes 1 and 2, as shown in lanes 3 and 4 respectively. To exclude nonspecific staining of KvLQT1 with anti-erg1, membrane proteins from cells transfected with only KvLQT1 were immunoprecipitated with anti-KvLQT1 and immunoblotted with anti-erg1 (lane 5), resulting in no detectable bands. CM, crude membrane extracts, IP, immunoprecipitation.



**Figure 7:** Representative results from co-immunoprecipitation of HERG and KvLQT1 in canine left ventricular crude membrane extracts. **A:** Immunoblotting of crude membrane extracts with anti-KvLQT1 antibody (lane 1) detected a band at ~75 kDa. Immunoprecipitation with anti-KvLQT1 followed by immunoblotting with anti-KvLQT1 revealed a similar band at ~75 kDa (lane 2). **B:** Co-immunoprecipitation of HERG and KvLQT1. Immunoblotting of crude membrane extracts with anti-erg1 antibody revealed bands at ~135 and ~155 kDa, that disappeared upon pre-incubation of the primary anti-erg1 antibody with the erg1 antigen (lane 2). Immunoprecipitation with anti-KvLQT1 followed by immunoblotting with anti-erg1 (lane 3) revealed the same bands as in lane 1. Pre-incubation of anti-erg1 with the erg1 antigen followed by immunoblotting of the KvLQT1-immunoprecipitated crude membrane extracts resulted in disappearance of the erg1 bands (lane 4). CM, crude membrane, IP, co-immunoprecipitation.





**Figure 8:** A: Results of KvLQT1 pull-down with GST-C-terminal HERG fusion protein. Immunoblotting with anti-KvLQT1 antibody (1:400) indicates effective pull-down of KvLQT1 protein (~75 kDa) with the C-terminal HERG-GST fusion protein (lane 1). Markers are shown on the left, lane 2 shows a sample of protein precleared with 10  $\mu$ g GST + sepharose beads, lane 3 shows a sample of solubilized

membrane preparation of cells expressing KvLQT1 protein. B: Immunoblotting of crude membrane extracts from cells transiently transfected with Kv3.4. Lane 1 shows bands at ~65 and ~85 kDa corresponding to Kv3.4, that disappear after pre-incubation with the specific control antigen (lane 2). C: experiments paralleling GST-pulldown experiment shown in panel A. Lane 1: a blot with anti-Kv3.4 after incubation with C-terminal HERG shows the absence of Kv3.4 bands that were present in GST pre-cleared and solubilized membrane samples (lanes 2 and 3) obtained before GST pulldown. Lane 4 shows absence of a non-specific interaction between GST-sepharose beads and Kv3.4.

**CHAPITRE VII: DISCUSSION GÉNÉRALE ET  
CONCLUSION**

Cette section retrace les principales observations faites lors de ces travaux de thèse et les met en perspective dans le cadre de la littérature.

### **I- Résumé des nouveaux éléments mis en lumière dans cette thèse et signification des résultats dans le contexte de la littérature.**

Nous avons, dans cette thèse, mis en évidence l'importance des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  dans la détermination des propriétés biophysiques et pharmacologiques de certains canaux potassiques cardiaques. Plusieurs études se sont appliquées à décrire des interactions entre sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  démontrant par le fait même leur importance dans la reconstitution de canaux ioniques endogènes.

Ainsi, la première interaction qui a été rapportée est celle entre la sous-unité  $\alpha$  KvLQT1 et la sous-unité  $\beta$  minK (Sanguinetti *et al.*, 1996). La co-expression de ces deux sous-unités reproduit avec fidélité les différentes propriétés ioniques et pharmacologiques du courant endogène cardiaque  $I_{Ks}$  (Sanguinetti *et al.*, 1996). La découverte de ce principe voulant qu'un courant endogène soit constitué non pas d'une mais de plusieurs sous-unités a été d'une importance majeure dans l'amélioration des connaissances de la base moléculaire des courants endogènes cardiaques. Outre KvLQT1 et minK, d'autres interactions ont été mises en évidence. Ainsi en 1999, la sous-unité  $\beta$  MiRP1 fut associée à la sous-unité  $\alpha$  HERG pour former le courant natif  $I_{Kr}$  (Abbott *et al.*, 1999). La sous-unité  $\beta$  KChIP2 fut elle associée aux sous-unités  $\alpha$  de la famille Kv4 afin de reproduire les caractéristiques du courant endogène  $I_{to}$ , notamment en accélérant la réactivation et en déplaçant la dépendance au voltage de l'inactivation vers des potentiels plus positifs (An *et al.*, 2000). Suite à l'identification de ces interactions, il est devenu important de déterminer comment les sous-unités  $\beta$  modulaient l'activité des sous-unités  $\alpha$  en étudiant leurs fonctions moléculaires.

## I-1 Inactivation de Kv4.2

Relativement peu d'études ont été effectuées sur les effets de mutations spécifiques sur les propriétés des canaux de la famille Kv4, particulièrement Kv4.2 et Kv4.3 qui sont importantes au niveau cardiaque. Zhu et al ont cloné une séquence correspondant à Kv4.2 humain, l'ont exprimé dans des cellules de mammifères et ont étudié ses propriétés électrophysiologiques (Zhu *et al.*, 1999). L'inactivation était bi-exponentielle et l'élimination des 38 premiers acides aminés (extrémité N-terminale) avait pour effet de doubler la constante de temps de la phase rapide de l'inactivation et d'augmenter la contribution de la phase lente de l'inactivation de 20 à 50% (Zhu *et al.*, 1999). Ces résultats sont en accord avec nos expériences montrant le ralentissement de l'inactivation de Kv4.2 suite à l'élimination d'une plus grande portion de la partie N-terminale, sans toutefois l'éliminer comme observé dans Kv1.4 (Tseng-Crank *et al.*, 1993).

Jerng et Covarrubias ont étudié l'effet de l'élimination des extrémités N- et C-terminale sur Kv4.1 (Jerng & Covarrubias, 1997). Ceci avait pour effet de supprimer la partie la plus rapide de l'inactivation tri-exponentielle de Kv4.1. L'application de TEA intracellulaire et extracellulaire n'avait pas d'effet sur l'inactivation tandis que l'augmentation de la concentration de potassium extracellulaire avait pour conséquence d'accélérer l'inactivation et de ralentir la réactivation. Effets n'étant pas en accord avec les descriptions faites de l'inactivation de type N et de l'inactivation de type C. Le même groupe a également étudié les effets de la mutation de résidus valine en isoleucine (résidus 404 et 406, correspondant à 402 et 404 dans Kv4.2) situés dans le sixième segment transmembranaire pouvant affecter la relation exclusive existant entre l'inactivation et le bloc par le 4-AP de l'état fermé du canal (Jerng *et al.*, 1999). Ils ont démontré que la mutation de ces deux valines en isoleucine ralentissait l'inactivation d'environ 100 fois, déplaçait les courbes de dépendance au voltage de l'activation et de l'inactivation vers des potentiels plus négatifs et plus positifs respectivement. La réactivation n'était pas affectée mais la désactivation (fermeture) du canal à des potentiels négatifs était ralentie. Les effets de l'élimination des deux extrémités N- et C-terminales et ceux de la mutation des résidus valine sont indépendants et ne suggèrent donc pas l'implication des résidus

valine comme un site de liaison pour une éventuelle particule tel que décrit par le mécanisme de type N. Il était plutôt suggéré que la mutation des résidus valine provoquait la stabilisation du canal à l'état ouvert et la perturbation de l'inactivation de l'état fermé. Nos résultats, obtenus à partir de Kv4.2 sont quelque peu différents de ceux observés par Jerng et al puisque l'inactivation de Kv4.2 est biexponentielle (au lieu de triexponentielle dans Kv4.1). Par ailleurs, nous avons observé que la mutation des résidus 402 et 404 ne ralentissait la portion rapide de l'inactivation que 4 fois, que la dépendance au voltage de l'activation était inchangée, et que la réactivation était ralentie.

La combinaison de l'élimination des extrémités N- et C-terminale avec la mutation des résidus valine n'avait pas d'effets additionnels comparé à ceux observés avec la mutation des valines seule (Jerng *et al.*, 1999). Cependant, l'association de l'élimination de la partie N-terminale avec la mutation des résidus valine dans Kv4.2 a eu des effets plus importants que chaque mutation individuelle, notamment sur les cinétiques d'inactivation et la dépendance au voltage de l'inactivation. Ceci suggère d'une part des différences dans le mécanisme d'inactivation de Kv4.2 et Kv4.1 et d'autre part, des interactions potentielles entre l'extrémité N-terminale et les résidus valine en position 402 et 404 dans Kv4.2.

L'observation la plus intéressante est que malgré l'impact réduit de la partie N-terminale dans l'inactivation de Kv4.2, celle-ci est capable de restaurer l'inactivation rapide de Kv1.4, éliminée par l'enlèvement de sa partie N-terminale. La protéine chimérique ainsi formée possède les cinétiques d'inactivation de Kv4.2 mais partage la dépendance au voltage de l'inactivation avec Kv1.4. La vitesse de réactivation de la protéine chimérique se situe entre celle de Kv4.2 qui est rapide et celle de Kv1.4 qui est lente, suggérant l'implication de motifs moléculaires présents dans la partie N-terminale de Kv4.2 qui influencent les propriétés de réactivation de Kv1.4. Ainsi, cette réactivation intermédiaire peut s'expliquer par le fait que la protéine chimérique partage les propriétés d'inactivation de Kv4.2 et de Kv1.4, soit qu'une partie des canaux se trouvent dans un état ouvert inactivé ( $I_O$ ), et que l'autre partie se trouve dans un état fermé inactivé ( $I_C$ ). La réactivation du canal lorsque celui-ci s'accumule à l'état fermé inactivé étant plus rapide puisqu'il a un état de transition en moins à passer (état ouvert) (figure 10). L'accumulation des canaux dans

ces différents états pourrait donc permettre d'expliquer cette réactivation intermédiaire.

Plus récemment, il a été démontré que la mutation des mêmes résidus valine dans Kv4.3 provoquait une altération de la structure du pore du canal, reproduisant les résultats obtenus dans Kv4.2 (Wang *et al.*, 2002).

### **I-2 Effets de la quinidine et de la flécainide sur Kv4.2.**

Les agents antiarythmiques de classe I sont des bloqueurs de canaux sodiques. Cependant, certains d'entre eux possèdent la propriété d'agir sur les canaux potassiques, allongeant ainsi le potentiel d'action cardiaque. Il en est ainsi pour la quinidine et la flécainide qui ont la capacité de bloquer le courant transitoire sortant  $I_{to}$  et le courant retardé à rectification  $I_K$  chez plusieurs espèces dont l'humain (Hiraoka *et al.*, 1986; Imaizumi & Giles, 1987; Vanhoutte *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1995). Chez 1 à 3% des patients exposés à la quinidine, il y a une apparition caractéristique de torsades de pointe. Sur l'électrocardiogramme, cette tachycardie polymorphe survient suite à l'allongement excessif du segment QT (Roden *et al.*, 1986). La flécainide quant à elle n'est pas associée aux tachycardies polymorphes de type torsade de pointes. Par contre, elle peut être à l'origine d'effets proarythmiques chez les patients ayant des tachycardies ventriculaires préexistantes ou un infarctus du myocarde (cardiac arrhythmia suppression trial, CAST) (the CAST investigators, 1989). L'importance du sixième segment transmembranaire a été suggérée dans le mode d'action du 4-AP sur Kv1.4 et Kv4.2 (Tseng, 1999). La mutation du résidu acide aminé en position 529 dans le segment transmembranaire S6 de Kv1.4 provoque une diminution de l'affinité de la quinidine et du 4-AP (Zhang *et al.*, 1998). Des études menées sur les canaux sodiques, calciques et potassiques ont suggéré que le sixième segment transmembranaire jouait un rôle important dans la liaison d'agents pharmacologiques et que les interactions hydrophobes entre la molécule et les résidus du segment S6 sont responsables de la stabilisation de la liaison du composé (Baukrowitz & Yellen, 1996; Hockerman *et al.*, 1995; Ragsdale *et al.*, 1996). Nos résultats démontrent également l'importance du sixième segment transmembranaire dans les propriétés de bloc de la quinidine et de la flécainide puisque la mutation des

résidus valine en position 402 et 404 en isoleucine élimine la propriété de dépendance au voltage du bloc des deux composés. Ceci démontre également que la dépendance au voltage du bloc par la quinidine et par la flécainide n'est pas dépendante du mode de fixation de l'agent pharmacologique (état ouvert ou inactivé du canal) mais plutôt d'éléments structuraux situés dans le sixième segment transmembranaire. Ainsi, il se pourrait que ces résidus valine jouent un rôle critique dans la détermination de la réponse du complexe médicament-récepteur au changement de potentiels.

### I-3 Modulation de Kv4.2 par KChIP2

L'intérêt s'est récemment porté sur la modulation des sous-unités Kv4 par KChIP2. En effet, le courant transitoire sortant  $I_{to}$  suit un gradient d'expression à travers la paroi du ventricule chez le chien et l'humain probablement dû à un gradient d'expression de KChIP2 au niveau ARN messager (Rosati *et al.*, 2001) et protéique (Rosati *et al.*, 2003) alors que la sous-unité  $\alpha$  Kv4.3 est exprimée uniformément à travers la paroi du ventricule (Rosati *et al.*, 2003). Plusieurs études se sont appliquées à décrire les propriétés cinétiques de Kv4 et leur modulation par KChIP2. Ainsi, Wang et al ont suggéré que la partie interne du pore était un facteur important dans les effets modulateurs de KChIP2 sur Kv4, et ce, en effectuant des mutations ciblant les domaines transmembranaires S6 dans Kv4.3 (Wang *et al.*, 2002). Par ailleurs, Bahring et al ont étudié en détail les effets de KChIP2 sur Kv4.2, rapportant l'augmentation de l'expression de courant à la surface membranaire, l'accélération de la réactivation et le déplacement de la dépendance au voltage de l'inactivation vers des potentiels plus positifs (Bahring *et al.*, 2001b). Ils ont également démontré l'importance de l'extrémité N-terminal dans la médiation de ces effets (Bahring *et al.*, 2001b). Lors de nos travaux, en plus de confirmer les observations de Wang et al et de Bahring et al sur Kv4.2, nous avons mis en évidence le fait que le transfert de l'extrémité N-terminale de Kv4.2 sur Kv1.4 était suffisant pour reproduire les effets de KChIP2 sur Kv1.4, non seulement en terme de cinétiques mais aussi en terme de densité de courant exprimé à la membrane. Ainsi, la partie N-terminale de Kv4.2 est suffisante pour transférer une partie des propriétés modulées par KChIP2 sur un canal normalement insensible à KChIP2.



Il est intéressant de corréler les effets de KChIP2 sur Kv4.2 avec les mécanismes d'inactivation de Kv4.2. Alors que nous avons démontré que le transfert de l'extrémité N-terminal de Kv4.2 sur Kv1.4 était suffisant pour reproduire certains effets de KChIP2 sur Kv1.4, Gebauer et al ont démontré que la partie N-terminale de Kv4.2 était aussi capable de conférer une inactivation rapide aux canaux présentant une inactivation lente tels que Kv2.1 et Kv1.5 (Gebauer *et al.*, 2004). La restauration de l'inactivation étant inhibée en présence de KChIP2. Les mécanismes d'inactivation de Kv4.2 sont relativement complexes et mettent en jeu des états inactivés différents. La production de la protéine chimérique nous a permis d'étudier l'importance de la partie N-terminale de Kv4.2 et sa modulation par KChIP2. Ainsi, l'une des caractéristiques de la modulation de Kv4.2 par KChIP2 est l'augmentation de la densité de courant exprimé à la membrane en présence de KChIP2. Ceci s'explique par la présence d'un signal de rétention situé dans l'extrémité N-terminale de Kv4.2 (Shibata *et al.*, 2003). Le remplacement de la partie N-terminale de Kv1.4 par celle de Kv4.2 a permis de transférer cette propriété à Kv1.4, réduisant ainsi son niveau d'expression à la membrane. KChIP2, en se liant à l'extrémité N-terminale de Kv4.2 permet de masquer ce signal de rétention et favorise le ciblage de la protéine canal à la membrane. Le transfert de propriétés d'un canal ionique vers un autre permet ainsi de mettre en évidence la fonction moléculaire de certaines parties d'une protéine canal, expliquant par le fait même la différence de fonction entre les sous-unités portant pourtant le même type de courant.

#### **I-4 Modulation de Kv3.4 par MiRP1**

L'importance de Kv3.4 au niveau cardiaque n'a été suggérée que récemment (Han *et al.*, 2002a). Ainsi, il existe peu d'études décrivant le rôle de la sous-unité  $\alpha$  Kv3.4 dans l'électrophysiologie cardiaque. Dans le muscle squelettique, Kv3.4 est fortement exprimé tant au niveau de l'ARN messager qu'au niveau protéique (Lesage *et al.*, 1992) mais aucun courant endogène ne possède les propriétés cinétiques de Kv3.4 lorsque celui-ci est exprimé dans un système d'expression. Du fait de la présence de la sous-unité MiRP2 dans le muscle squelettique, l'effet de MiRP2 sur Kv3.4 a été étudié et permis de mettre en évidence

leur interaction (Abbott *et al.*, 2001). Par ailleurs, il a récemment été démontré que MiRP1 pouvait interagir avec les sous-unités Kv3.1 et Kv3.2 (Lewis *et al.*, 2003), ralentissant leur désactivation et leur activation et accélérant leur inactivation. MiRP1 provoque également le déplacement de la dépendance au voltage de l'activation de Kv3.1 et Kv3.2 vers des potentiels plus négatifs (Lewis *et al.*, 2003). Dans cette thèse, nous rapportons l'interaction entre Kv3.4 et MiRP1 et suggérons l'implication de ce complexe dans l'électrophysiologie des fibres de Purkinje. En effet, nous rapportons également la présence de la sous-unité MiRP1 au niveau ARN messenger et protéique dans cette région. La modulation de Kv3.4 par MiRP1 est différente de celle exercée par MiRP2. En effet, MiRP2 déplace la dépendance au voltage de l'activation de Kv3.4 vers des potentiels plus négatifs, la réactivation est accélérée en présence de MiRP2 et la co-expression de MiRP2 avec Kv3.4 présente un courant entrant à des potentiels hyperpolarisants (Abbott *et al.*, 2001). Ceci diffère de la modulation de Kv3.4 par MiRP1 dans le sens où MiRP1 affecte les cinétiques d'inactivation de Kv3.4 en ralentissant l'inactivation et la réactivation. Aucun effet sur la dépendance au voltage de l'activation n'a pu être mise en évidence. Kv3.4 s'inactive par le mécanisme « Ball and Chain » (Antz *et al.*, 1997). Il est donc raisonnable de penser que MiRP1 interagit avec Kv3.4 de telle manière que son inactivation rapide est affectée. Il serait donc pertinent d'étudier plus en détail l'interaction entre ses deux sous-unités afin d'en comprendre les mécanismes.

MiRP1 et MiRP2, qui sont respectivement encodés par les gènes KCNE2 et KCNE3 ont un pourcentage d'homologie relativement faible (~35%) (Tinel *et al.*, 2000). Outre les sous-unités Kv3, MiRP1 module également HERG, Kv4.2 et HCN suggérant un rôle central dans la détermination de l'excitabilité cardiovasculaire à travers les courants endogènes  $I_{Kr}$ ,  $I_{to}$  et  $I_f$ . MiRP1 semblent donc avoir de multiples partenaires. La question est de savoir si ces interactions ont une importance physiologique ou non. MiRP1 a été associé au syndrome du QT long 6. Plusieurs mutations au niveau du gène KCNE2 rapporté chez des patients mènent à un allongement du potentiel d'action et du segment QT sur l'électrocardiogramme de surface. Initialement, le fait que MiRP1 interagisse avec HERG a permis de faire un lien entre l'allongement de la repolarisation ventriculaire et le syndrome du QT allongé observé chez ces patients (Abbott *et al.*, 1999). Cependant, il apparaît

désormais que l'expression de MiRP1 dans le ventricule est très limitée voire nulle. Par contre, l'expression de MiRP1 au niveau des fibres de Purkinje suggère que le phénotype de QT long observé est dû à un prolongement du potentiel d'action dans cette région. Ceci est en accord avec des observations cliniques montrant l'induction de fibrillation ventriculaire dans les fibres de Purkinje (Haissaguerre *et al.*, 2002; Nattel & Quantz, 1988).

MiRP1, en s'associant avec Kv3.4 rétablit certaines propriétés du courant transitoire sortant des fibres de Purkinje (sensibilité au TEA, ralentissement de la réactivation). Cependant, des discordances (telles que les cinétiques d'inactivation) demandent toujours à être éclaircies. Il n'est donc pas à exclure l'implication d'autres sous-unités dans ce courant.

### I-5 Modulation de HERG par KvLQT1

Il est généralement reconnu que les sous-unités  $\alpha$  sont modulées par des sous-unités  $\beta$ . Cependant, nous avons mis en évidence dans cette thèse la modulation d'une sous-unité  $\alpha$  (HERG) par une autre sous-unité  $\alpha$  (KvLQT1). C'est à notre connaissance la première observation de ce type. Il existe des différences notables entre le courant endogène  $I_{Kr}$  et le courant porté par l'expression de la sous-unité HERG dans les cellules de mammifères notamment au niveau de la réponse pharmacologique à certains agents (Sanguinetti *et al.*, 1995). Aussi, la désactivation des courants de queue de  $I_{HERG}$  est plus lente que celle du courant endogène  $I_{Kr}$  (Weerapura *et al.*, 2002). L'implication d'une sous-unité modulatrice est généralement suggérée lorsqu'une sous-unité  $\alpha$  exprimée seule ne récapitule pas les propriétés du courant endogène. Ainsi, MiRP1 fut un candidat à la reconstitution du courant endogène  $I_{Kr}$  (Abbott *et al.*, 1999). Comme nous l'avons déjà mentionné, l'expression de MiRP1 au niveau ventriculaire est très faible, limitant son rôle physiologique dans ce tissu. De plus, il a été démontré que la co-expression de MiRP1 et de HERG dans les cellules de mammifères ne restorait pas les propriétés du courant endogène, suggérant d'autres intervenants dans la formation de  $I_{Kr}$  (Weerapura *et al.*, 2002). La modulation de HERG par KvLQT1 récapitule certaines propriétés du courant endogène, notamment la désactivation des courants de queue

qui est accélérée lorsque les deux sous-unités sont co-exprimées. Cette interaction peut s'expliquer également au niveau fonctionnel puisque l'inhibition de  $I_{Kr}$  permet aux cardiomyocytes de passer plus de temps à des potentiels positifs, où  $I_{Ks}$  peut s'activer, permettant alors d'empêcher un prolongement excessif du potentiel d'action (Biliczki *et al.*, 2002; Varro *et al.*, 2000). En cas d'inhibition de  $I_{Ks}$ , les conséquences de la perte de  $I_{Kr}$  sont alors plus importantes et les risques de développer des arythmies plus élevés (Biliczki *et al.*, 2002; Varro *et al.*, 2000; Zeng *et al.*, 1995). L'interaction entre ces deux sous-unités suggère la formation d'un complexe où les courants  $I_{Kr}$  et  $I_{Ks}$  seraient co-existants, et ce malgré des propriétés biophysiques et pharmacologiques distinctes. La formation de complexes est également suggérée par le fait que des interactions entre les sous-unités MiRP1 et KvLQT1 (Tinel *et al.*, 2000), et entre minK et HERG ont aussi été mises en évidence (Kupersmidt *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1995b).

Cette notion de complexe a été suggérée dans les mécanismes de transduction du signal mettant en jeu l'homo et l'hétéromultimérisation des récepteurs couplés aux protéines G (Rebois & Hebert, 2003). Ainsi, la formation de ces complexes contribue à la spécificité et à l'efficacité du signal dans les cellules qui doivent gérer de nombreuses voies de transduction du signal.

Nous avons déterminé l'importance de l'extrémité C-terminale dans l'interaction entre HERG et KvLQT1. Des études de mutagenèse devraient permettre de localiser avec plus de précision le site d'interaction entre les deux sous-unités afin de déterminer l'éventuelle influence de mutations retrouvées dans HERG et KvLQT1 causant le syndrome du QT long sur cette interaction.

## II- Orientations futures

Malgré la découverte de sous-unités auxiliaires  $\beta$ , modulatrices de sous-unités  $\alpha$ , de nombreuses discordances persistent entre les courants endogènes cardiaques et les courants reconstitués dans des systèmes d'expression. Le courant transitoire sortant des fibres de Purkinje en est un bon exemple. Il est donc nécessaire d'explorer plus en profondeur la base moléculaire des courants endogènes cardiaques notamment par la fonction moléculaire des différentes sous-unités mises en jeu. Par ailleurs, une meilleure compréhension des fonctions moléculaires des différentes sous-unités potassiques permettra également l'élaboration d'agents pharmacologiques ciblant une fonction en particulier. Car jusqu'à présent, les médicaments sont choisis selon leur effet et non selon leur mécanisme d'action. Celui-ci n'est étudié que par la suite, afin de comprendre l'effet observé. La cristallisation des canaux ioniques fait partie de ces grandes avancées scientifiques des dernières années. Ainsi, la connaissance de la structure atomique de ces canaux a apporté une nouvelle dimension à notre compréhension de la fonction des canaux potassiques. Il est donc concevable de penser que la mise en évidence des fonctions moléculaires des sous-unités potassiques, en association avec la cristallisation des domaines mis en jeu puisse permettre le ciblage de ces fonctions par des agents pharmacologiques.

La normalisation de  $I_{to}$  par des agents pharmacologiques serait nécessaire afin de réduire l'hétérogénéité de la repolarisation dans le cas de l'hypertrophie cardiaque et de la défaillance cardiaque. Ainsi, un agent qui favoriserait l'ouverture du canal (un traitement par l'hormone thyroïde T3), ou un transfert de gène permettant l'augmentation de l'expression génique sera cliniquement bénéfique (Hoppe *et al.*, 2000; Shimoni, 1999). Dans un tel cas, la connaissance des mécanismes régissant l'inactivation du canal et le ciblage de la protéine canal à la membrane est nécessaire. Par exemple, il est possible d'imaginer qu'une pathologie mettant en jeu une diminution du courant transitoire sortant, résultant de la diminution de l'expression de KChIP2 (défaillance cardiaque, hypertrophie ?) pourrait être traité avec un homologue synthétique de KChIP2, afin de rétablir d'une

part le gradient transmural et d'autre part, l'expression normale du canal à la membrane.

L'approche du transfert génique est particulièrement attrayante puisqu'elle met en jeu des systèmes physiologiques. Plusieurs groupes ont ainsi utilisé cette technique afin de démontrer que l'injection d'un gène exprimant une protéine normalement pas ou peu exprimé dans le tissu cardiaque peut avoir des effets bénéfiques sur la durée du potentiel d'action. Il en est ainsi pour l'injection du gène KCNE3, codant pour la sous-unité MiRP2. Il a été démontré que MiRP2 interagit avec KvLQT1, résultant en l'augmentation de courant sortant (Schroeder *et al.*, 2000). Son niveau d'expression dans le tissu cardiaque est très faible. Ainsi, l'injection de KCNE3 dans la cavité ventriculaire de cobaye provoque un raccourcissement du potentiel d'action, due à l'augmentation du courant retardé à rectification (Mazhari *et al.*, 2002). Cette technique a aussi permis de transformer des cellules quiescentes ventriculaires en cellules pacemaker. Le courant à rectification entrante  $I_{K1}$  est responsable du maintien du potentiel de repos dans les cellules cardiaques. L'importance de son niveau d'expression dans le ventricule permet d'expliquer le potentiel de membrane très négatif de ces cellules. La mutation du gène codant pour Kir2.1 au niveau du pore a un effet dominant négatif sur son expression. L'injection du gène modifié provoque donc une diminution du niveau d'expression de  $I_{K1}$ , résultant en un potentiel de repos moins négatif et en une excitation de la cellule facilitée (Miake *et al.*, 2002).

L'exploitation thérapeutique des canaux potassiques sera facilitée par une meilleure connaissance de leur structure et de leur fonction. Les approches de mutagenèse et l'étude biophysique des canaux ont permis l'identification de domaines responsables de la sélectivité au potassium, du « gating », de l'assemblage entre sous-unités, et de la liaison aux agents pharmacologiques (Wickenden, 2002).

On a démontré dans nos travaux que l'utilisation de protéines chimériques pouvait nous informer sur certaines fonctions moléculaires telles que l'inactivation et l'interaction entre sous-unités. Mais ce concept peut aussi être utilisé dans le cadre d'études sur la sensibilité d'un canal à un composé pharmacologique spécifique, à

l'identification de sites de liaison d'un médicament sur sa cible moléculaire, ou finalement à l'étude des propriétés biophysiques d'un canal.

### **III- Conclusion**

Les connaissances sur les canaux ioniques cardiaques et sur leur base moléculaire ont connu une véritable embellie ces dernières années. La découverte des sous-unités modulatrices (sous-unités  $\beta$ ) a permis d'expliquer les propriétés électrophysiologiques de certains canaux endogènes jusque là incomprises. Ainsi, les sous-unités minK, MiRP1 et KChIP2 ont été clonées et rattachées à une sous-unité  $\alpha$  afin d'expliquer, parfois en partie seulement les propriétés de canaux endogènes.

Une étude récente publiée par Deschêne et al a démontré que la sous-unité  $\alpha$  Kv4.3 pouvait être modulée par un certain nombre de sous-unités  $\beta$  dans des cellules de mammifères questionnant la pertinence de ces systèmes d'expression et leur extrapolation au niveau physiologique (Deschênes & Tomaselli, 2002). On a déjà souligné le fait que MiRP1 était capable de moduler les propriétés électrophysiologiques de nombreuses sous-unités mais que son importance physiologique était limitée, du moins dans le ventricule où son expression est très faible. Dans le futur, on devra donc s'attacher à démontrer l'importance physiologique des interactions entre sous-unités et étudier leur importance dans les pathologies cardiaques.

## **CHAPITRE VIII : RÉFÉRENCES**



Abbott, G. W., Butler, M. H., Bendahhou, S., Dalakas, M. C., Ptacek, L. J., & Goldstein, S. A. (2001). MiRP2 forms potassium channels in skeletal muscle with Kv3.4 and is associated with periodic paralysis. *Cell* **104**, 217-231.

Abbott, G. W., Sesti, F., Splawski, I., Buck, M. E., Lehmann, M. H., Timothy, K. W., Keating, M. T., & Goldstein, S. A. (1999). MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell* **97**, 175-187.

Ackerman, M. J. (1998). The long QT syndrome: ion channel diseases of the heart. *Mayo Clin.Proc.* **73**, 250-269.

Adaniya, H. & Hiraoka, M. (1990). Effects of a novel class III antiarrhythmic agent, E-4031, on reentrant tachycardias in rabbit right atrium. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* **15**, 976-982.

Amos, G. J., Wettwer, E., Metzger, F., Li, Q., Himmel, H. M., & Ravens, U. (1996). Differences between outward currents of human atrial and subepicardial ventricular myocytes. *J.Physiol* **491** ( Pt 1), 31-50.

An, W. F., Bowlby, M. R., Betty, M., Cao, J., Ling, H. P., Mendoza, G., Hinson, J. W., Mattsson, K. I., Strassle, B. W., Trimmer, J. S., & Rhodes, K. J. (2000). Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature* **403**, 553-556.

Antz, C., Geyer, M., Fakler, B., Schott, M. K., Guy, H. R., Frank, R., Ruppersberg, J. P., & Kalbitzer, H. R. (1997). NMR structure of inactivation gates from mammalian voltage-dependent potassium channels. *Nature* **385**, 272-275.

Antzelevitch, C. (2001a). Molecular basis for the transmural distribution of the transient outward current. *J.Physiol* **533**, 1.

Antzelevitch, C. (2001b). Molecular biology and cellular mechanisms of Brugada and long QT syndromes in infants and young children. *J Electrocardiol.* **34 Suppl**, 177-181.

Antzelevitch, C. & Fish, J. (2001). Electrical heterogeneity within the ventricular wall. *Basic Res Cardiol.* **96**, 517-527.

Antzelevitch, C., Sicouri, S., Litovsky, S. H., Lukas, A., Krishnan, S. C., Di Diego, J. M., Gintant, G. A., & Liu, D. W. (1991). Heterogeneity within the ventricular wall.

Electrophysiology and pharmacology of epicardial, endocardial, and M cells. *Circ.Res.* **69**, 1427-1449.

Anumonwo, J. M., Freeman, L. C., Kwok, W. M., & Kass, R. S. (1992). Delayed rectification in single cells isolated from guinea pig sinoatrial node. *Am J Physiol* **262**, H921-H925.

Armstrong, C. M. (1969). Inactivation of the potassium conductance and related phenomena caused by quaternary ammonium ion injection in squid axons. *J Gen.Physiol* **54**, 553-575.

Armstrong, C. M. (1971). Interaction of tetraethylammonium ion derivatives with the potassium channels of giant axons. *J Gen.Physiol* **58**, 413-437.

Babila, T., Moscucci, A., Wang, H., Weaver, F. E., & Koren, G. (1994). Assembly of mammalian voltage-gated potassium channels: evidence for an important role of the first transmembrane segment [published erratum appears in *Neuron* 1996 May;16(5):following 1060]. *Neuron* **12**, 615-626.

Bahring, R., Boland, L. M., Varghese, A., Gebauer, M., & Pongs, O. (2001a). Kinetic analysis of open- and closed-state inactivation transitions in human Kv4.2 A-type potassium channels. *J Physiol* **535**, 65-81.

Bahring, R., Dannenberg, J., Peters, H. C., Leicher, T., Pongs, O., & Isbrandt, D. (2001b). Conserved Kv4 N-terminal domain critical for effects of Kv channel-interacting protein 2.2 on channel expression and gating. *J Biol.Chem.* **276**, 23888-23894.

Balser, J. R. (2001). The cardiac sodium channel: gating function and molecular pharmacology. *J.Mol.Cell Cardiol.* **33**, 599-613.

Balser, J. R., Bennett, P. B., & Roden, D. M. (1990). Time-dependent outward current in guinea pig ventricular myocytes. Gating kinetics of the delayed rectifier. *J.Gen.Physiol* **96**, 835-863.

Barhanin, J., Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Lazdunski, M., & Romey, G. (1996). K(V)LQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current. *Nature* **384**, 78-80.

Barry, D. M., Xu, H., Schuessler, R. B., & Nerbonne, J. M. (1998). Functional knockout of the transient outward current, long-QT syndrome, and cardiac remodeling in mice expressing a dominant-negative Kv4 alpha subunit. *Circ.Res.* **83**, 560-567.

Baukrowitz, T. & Yellen, G. (1996). Use-dependent blockers and exit rate of the last ion from the multi-ion pore of a K<sup>+</sup> channel. *Science* **271**, 653-656.

Beck, E. J. & Covarrubias, M. (2001). Kv4 channels exhibit modulation of closed-state inactivation in inside-out patches. *Biophys.J.* **81**, 867-883.

Berger, F., Borchard, U., Hafner, D., Kammer, T., Weis, T. (1995). Modulation of action potential duration by inhibition of the transient outward current in sheep cardiac Purkinje fibers. *Basic. Res. Cardiol.* **90**, 185-191.

Beuckelmann, D. J., Nabauer, M., & Erdmann, E. (1993). Alterations of K<sup>+</sup> currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ.Res.* **73**, 379-385.

Biliczki, P., Virag, L., Iost, N., Papp, J. G., & Varro, A. (2002). Interaction of different potassium channels in cardiac repolarization in dog ventricular preparations: role of repolarization reserve. *Br.J Pharmacol.* **137**, 361-368.

Black, S. C., Chi, L. G., Mu, D. X., & Lucchesi, B. R. (1991). The antifibrillatory actions of UK-68,798, a class III antiarrhythmic agent. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **258**, 416-423.

Bleich, M., Briel, M., Busch, A. E., Lang, H. J., Gerlach, U., Gogelein, H., Greger, R., & Kunzelmann, K. (1997). KVLQT channels are inhibited by the K<sup>+</sup> channel blocker 293B. *Pflugers Arch.* **434**, 499-501.

Bosch, R. F., Zeng, X., Grammer, J. B., Popovic, K., Mewis, C., & Kuhlkamp, V. (1999). Ionic mechanisms of electrical remodeling in human atrial fibrillation. *Cardiovasc.Res* **44**, 121-131.

Bou-Abboud, E., Li, H., & Nerbonne, J. M. (2000). Molecular diversity of the repolarizing voltage-gated K<sup>+</sup> currents in mouse atrial cells. *J.Physiol* **529 Pt 2**, 345-358.

Boyle, W. A. & Nerbonne, J. M. (1991). A novel type of depolarization-activated K<sup>+</sup> current in isolated adult rat atrial myocytes. *Am.J.Physiol* **260**, H1236-H1247.

Brahmajothi, M. V., Campbell, D. L., Rasmusson, R. L., Morales, M. J., Trimmer, J. S., Nerbonne, J. M., & Strauss, H. C. (1999). Distinct transient outward potassium current (I<sub>to</sub>) phenotypes and distribution of fast-inactivating potassium channel alpha subunits in ferret left ventricular myocytes. *J Gen.Physiol* **113**, 581-600.

Brahmajothi, M. V., Morales, M. J., Liu, S., Rasmusson, R. L., Campbell, D. L., & Strauss, H. C. (1996). In situ hybridization reveals extensive diversity of K<sup>+</sup> channel mRNA in isolated ferret cardiac myocytes. *Circ.Res.* **78**, 1083-1089.

Brahmajothi, M. V., Morales, M. J., Reimer, K. A., & Strauss, H. C. (1997). Regional localization of ERG, the channel protein responsible for the rapid component of the delayed rectifier, K<sup>+</sup> current in the ferret heart. *Circ Res* **81**, 128-135.

Brooksby, P., Levi, A. J., & Jones, J. V. (1993). The electrophysiological characteristics of hypertrophied ventricular myocytes from the spontaneously hypertensive rat. *J.Hyperten* 611-622.

Bryant, S. M., Wan, X., Shipsey, S. J., & Hart, G. (1998). Regional differences in the delayed rectifier current (I<sub>Kr</sub> and I<sub>Ks</sub>) contribute to the differences in action potential duration in basal left ventricular myocytes in guinea-pig. *Cardiovasc.Res* **40**, 322-331.

Buchanan, L. V., Kabell, G., Turcotte, U. M., Brunden, M. N., & Gibson, J. K. (1992). Effects of ibutilide on spontaneous and induced ventricular arrhythmias in 24-hour canine myocardial infarction: a comparative study with sotalol and encainide. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* **19**, 256-263.

Burnashev, N. A. & Zilberter, Y. (1986). Two types of single inward rectifying potassium channels in rat myocardial cells. *Gen.Physiol Biophys.* **5**, 495-504.

Busch, A. E., Suessbrich, H., Waldegger, S., Sailer, E., Greger, R., Lang, H., Lang, F., Gibson, K. J., & Maylie, J. G. (1996). Inhibition of I<sub>Ks</sub> in guinea pig cardiac myocytes and guinea pig I<sub>sK</sub> channels by the chromanol 293B. *Pflugers Arch.* **432**, 1094-1096.

Caballero, R., Delpon, E., Valenzuela, C., Longobardo, M., Tamargo, J. (2000). Losartan and its metabolite E3174 modify cardiac delayed rectifier K<sup>(+)</sup> currents. *Circulation* **101**, 1199-1205.

Caballero, R., Delpon, E., Valenzuela, C., Longobardo, M., Gonzalez, T., Tamargo, J. (2001). Direct effects of candesartan and eprosartan on human cloned potassium channels involved in cardiac repolarization. *Mol. Pharmacol.* **59**, 825-836.

Camm, A. J., Janse, M. J., Roden, D. M., Rosen, M. R., Cinca, J., & Cobbe, S. M. (2000). Congenital and acquired long QT syndrome. *Eur. Heart J.* **21**, 1232-1237.

CAST investigators (1989). Preliminary report: effect of encainide and flecainide on mortality in a randomized trial of arrhythmia suppression after myocardial infarction. The Cardiac Arrhythmia Suppression Trial (CAST) Investigators. *N. Engl. J. Med.* **321**, 406-412.

Cerbai, E., Barbieri, M., Li, Q., & Mugelli, A. (1994). Ionic basis of action potential prolongation of hypertrophied cardiac myocytes isolated from hypertensive rats of different ages. *Cardiovasc. Res* **28**, 1180-1187.

Choi, K. L., Aldrich, R. W., & Yellen, G. (1991). Tetraethylammonium blockade distinguishes two inactivation mechanisms in voltage-activated K<sup>+</sup> channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **88**, 5092-5095.

Choi, K. L., Mossman, C., Aube, J., & Yellen, G. (1993). The internal quaternary ammonium receptor site of Shaker potassium channels. *Neuron* **10**, 533-541.

Chouabe, C., Neyroud, N., Guicheney, P., Lazdunski, M., Romey, G., & Barhanin, J. (1997). Properties of KvLQT1 K<sup>+</sup> channel mutations in Romano-Ward and Jervell and Lange-Nielsen inherited cardiac arrhythmias. *EMBO J.* **16**, 5472-5479.

Coetzee, W. A., Amarillo, Y., Chiu, J., Chow, A., Lau, D., McCormack, T., Moreno, H., Nadal, M. S., Ozaita, A., Pountney, D., Saganich, M., Vega-Saenz, d. M., & Rudy, B. (1999). Molecular diversity of K<sup>+</sup> channels. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **868**, 233-285.

Colatsky, T. J. (1982). Mechanisms of action of lidocaine and quinidine on action potential duration in rabbit cardiac Purkinje fibers. An effect on steady state sodium currents? *Circ Res* **50**, 17-27.

Compton, S. J., Lux, R. L., Ramsey, M. R., Strellich, K. R., Sanguinetti, M. C., Green, L. S., Keating, M. T., & Mason, J. W. (1996). Genetically defined therapy of inherited long-QT syndrome. Correction of abnormal repolarization by potassium. *Circulation* **94**, 1018-1022.

Corey, S., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., & Clapham, D. E. (1998). Number and stoichiometry of subunits in the native atrial G-protein-gated K<sup>+</sup> channel, IKACH. *J.Biol.Chem.* **273**, 5271-5278.

Courtemanche, M., Ramirez, R.J., Nattel, S. (1998). Ionic mechanisms underlying human atrial action potential properties: insights from a mathematical model. *Am. J. Physiol.* **275**, H301-H321.

Curran, M. E., Splawski, I., Timothy, K. W., Vincent, G. M., Green, E. D., & Keating, M. T. (1995). A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell* **80**, 795-803.

Danielsson, B.R., Lansdell, K., Patmore, L., Tomson, T. (2003). Phenytoin and phenobarbital inhibit human HERG potassium channels. *Epilepsy Res.* **55**, 147-157.

Dascal, N. (1997). Signalling via the G protein-activated K<sup>+</sup> channels. *Cell Signal.* **9**, 551-573.

Dascal, N., Schreiber, W., Lim, N. F., Wang, W., Chavkin, C., DiMugno, L., Labarca, C., Kieffer, B. L., Gaveriaux-Ruff, C., Trollinger, D., & . (1993). Atrial G protein-activated K<sup>+</sup> channel: expression cloning and molecular properties. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**, 10235-10239.

Decher, N., Uyguner, O., Scherer, C. R., Karaman, B., Yuksel-Apak, M., Busch, A. E., Steinmeyer, K., & Wollnik, B. (2001). hKChIP2 is a functional modifier of hKv4.3 potassium channels: cloning and expression of a short hKChIP2 splice variant. *Cardiovasc.Res.* **52**, 255-264.

Demo, S. D. & Yellen, G. (1991). The inactivation gate of the Shaker K<sup>+</sup> channel behaves like an open- channel blocker. *Neuron* **7**, 743-753.

Demolombe, S., Baro, I., Pereon, Y., Bliet, J., Mohammad-Panah, R., Pollard, H., Morid, S., Mannens, M., Wilde, A., Barhanin, J., Charpentier, F., & Escande, D. (1998). A dominant negative isoform of the long QT syndrome 1 gene product. *J.Biol.Chem.* **273**, 6837-6843.

Deschenes, I., DiSilvestre, D., Juang, G. J., Wu, R. C., An, W. F., & Tomaselli, G. F. (2002). Regulation of Kv4.3 current by KChIP2 splice variants: a component of native cardiac I(to)? *Circulation* **106**, 423-429.

Deschenes, I. & Tomaselli, G. F. (2002). Modulation of Kv4.3 current by accessory subunits. *FEBS Lett.* **528**, 183-188.

Dessertenne, F. (1966). La tachycardie ventriculaire a deux foyers opposés variables. *Arch Mal Coeur* **59**, 263-272.

Di Diego, J. M., Sun, Z. Q., & Antzelevitch, C. (1996). I(to) and action potential notch are smaller in left vs. right canine ventricular epicardium. *Am.J.Physiol* **271**, H548-H561.

Dixon, J. E. & McKinnon, D. (1994). Quantitative analysis of potassium channel mRNA expression in atrial and ventricular muscle of rats. *Circ Res* **75**, 252-260.

Dixon, J. E., Shi, W., Wang, H. S., McDonald, C., Yu, H., Wymore, R. S., Cohen, I. S., & McKinnon, D. (1996). Role of the Kv4.3 K<sup>+</sup> channel in ventricular muscle. A molecular correlate for the transient outward current [published erratum appears in *Circ Res* 1997 Jan;80(1):147]. *Circ.Res.* **79**, 659-668.

Dobrzynski, H., Marples, D. D., Musa, H., Yamanushi, T. T., Henderson, Z., Takagishi, Y., Honjo, H., Kodama, I., & Boyett, M. R. (2001). Distribution of the muscarinic K<sup>+</sup> channel proteins Kir3.1 and Kir3.4 in the ventricle, atrium, and sinoatrial node of heart. *J Histochem.Cytochem.* **49**, 1221-1234.

Doyle, D. A., Morais, C. J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., & MacKinnon, R. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity [see comments]. *Science* **280**, 69-77.

Duchatelle-Gourdon, I., Lagrutta, A. A., & Hartzell, H. C. (1991). Effects of Mg<sup>2+</sup> on basal and beta-adrenergic-stimulated delayed rectifier potassium current in frog atrial myocytes. *J Physiol* **435**, 333-347.

Dumaine, R., Wu, Y. S., & Antzelevitch, C. Distribution of KvLQT1 but not mink parallels the distribution of IKs in the mid-myocardium of canine heart. *Biophys J* [76]. 2000.

Ref Type: Abstract

Eghbali, M., Olcese, R., Zarei, M. M., Toro, L., & Stefani, E. (2002). External pore collapse as an inactivation mechanism for kv4.3 k<sup>+</sup> channels. *J.Membr.Biol.* **188**, 73-86.

England, S. K., Uebele, V. N., Kodali, J., Bennett, P. B., & Tamkun, M. M. (1995a). A novel K<sup>+</sup> channel beta-subunit (hKv beta 1.3) is produced via alternative mRNA splicing. *J.Biol.Chem.* **270**, 28531-28534.

England, S. K., Uebele, V. N., Shear, H., Kodali, J., Bennett, P. B., & Tamkun, M. M. (1995b). Characterization of a voltage-gated K<sup>+</sup> channel beta subunit expressed in human heart. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**, 6309-6313.

Fakler, B., Brandle, U., Bond, C., Glowatzki, E., Konig, C., Adelman, J. P., Zenner, H. P., & Ruppersberg, J. P. (1994). A structural determinant of differential sensitivity of cloned inward rectifier K<sup>+</sup> channels to intracellular spermine. *FEBS Lett* **356**, 199-203.

Fakler, B., Brandle, U., Glowatzki, E., Weidemann, S., Zenner, H. P., & Ruppersberg, J. P. (1995). Strong voltage-dependent inward rectification of inward rectifier K<sup>+</sup> channels is caused by intracellular spermine. *Cell* **80**, 149-154.

Farkas, A., Lepran, I., & Papp, J. G. (1998). Comparison of the antiarrhythmic and the proarrhythmic effect of almokalant in anaesthetised rabbits. *Eur.J.Pharmacol.* **346**, 245-253.

Fedida, D., Wible, B., Wang, Z., Fermini, B., Faust, F., Nattel, S., & Brown, A. M. (1993). Identity of a novel delayed rectifier current from human heart with a cloned K<sup>+</sup> channel current. *Circ Res* **73**, 210-216.

Feng, J., Wible, B., Li, G. R., Wang, Z., & Nattel, S. (1997). Antisense oligodeoxynucleotides directed against Kv1.5 mRNA specifically inhibit ultrarapid delayed rectifier K<sup>+</sup> current in cultured adult human atrial myocytes. *Circ.Res.* **80**, 572-579.

Feng, J., Xu, D., Wang, Z., & Nattel, S. (1998a). Ultrarapid delayed rectifier current inactivation in human atrial myocytes: properties and consequences. *Am.J.Physiol* **275**, H1717-H1725.

Feng, J., Yue, L., Wang, Z., & Nattel, S. (1998b). Ionic mechanisms of regional action potential heterogeneity in the canine right atrium. *Circ.Res.* **83**, 541-551.

Ficker, E., Tagliatela, M., Wible, B. A., Henley, C. M., & Brown, A. M. (1994). Spermine and spermidine as gating molecules for inward rectifier K<sup>+</sup> channels. *Science* **266**, 1068-1722.



Findlay, I. (1994). The ATP sensitive potassium channel of cardiac muscle and action potential shortening during metabolic stress. *Cardiovasc.Res* **28**, 760-761.

Fiset, C., Clark, R. B., Larsen, T. S., & Giles, W. R. (1997a). A rapidly activating sustained K<sup>+</sup> current modulates repolarization and excitation-contraction coupling in adult mouse ventricle. *J.Physiol* **504** ( Pt 3), 557-563.

Fiset, C., Clark, R. B., Shimoni, Y., & Giles, W. R. (1997b). Shal-type channels contribute to the Ca<sup>2+</sup>-independent transient outward K<sup>+</sup> current in rat ventricle. *J Physiol (Lond)* **500** ( Pt 1), 51-64.

Freeman, L. C. & Kass, R. S. (1993). Expression of a minimal K<sup>+</sup> channel protein in mammalian cells and immunolocalization in guinea pig heart. *Circ.Res.* **73**, 968-973.

Furukawa, T., Myerburg, R. J., Furukawa, N., Bassett, A. L., & Kimura, S. (1990). Differences in transient outward currents of feline endocardial and epicardial myocytes. *Circ Res* **67**, 1287-1291.

Furukawa, T., Myerburg, R. J., Furukawa, N., Kimura, S., & Bassett, A. L. (1994). Metabolic inhibition of I<sub>Ca,L</sub> and I<sub>K</sub> differs in feline left ventricular hypertrophy. *Am J Physiol* **266**, H1121-H1131.

Furutani, M., Trudeau, M. C., Hagiwara, N., Seki, A., Gong, Q., Zhou, Z., Imamura, S., Nagashima, H., Kasanuki, H., Takao, A., Momma, K., January, C. T., Robertson, G. A., & Matsuoka, R. (1999). Novel mechanism associated with an inherited cardiac arrhythmia: defective protein trafficking by the mutant HERG (G601S) potassium channel. *Circulation* **99**, 2290-2294.

Gebauer, M., Isbrandt, D., Sauter, K., Callsen, B., Nolting, A., Pongs, O., & Bähring, R. (2004). N-type Inactivation Features of Kv4.2 Channel Gating. *Biophys J* **86**, 210-223.

Giles, W. R. & Imaizumi, Y. (1988). Comparison of potassium currents in rabbit atrial and ventricular cells. *J.Physiol* **405**, 123-145.

Gogelein, H., Bruggemann, A., Gerlach, U., Brendel, J., & Busch, A. E. (2000). Inhibition of I<sub>Ks</sub> channels by HMR 1556. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* **362**, 480-488.

Goldstein, S. A. & Miller, C. (1993). Mechanism of charybdotoxin block of a voltage-gated K<sup>+</sup> channel. *Biophys.J.* **65**, 1613-1619.

Gong, Q., Anderson, C. L., January, C. T., & Zhou, Z. (2002). Role of glycosylation in cell surface expression and stability of HERG potassium channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**, H77-H84.

Grant, A. O., Whalley, D. W., & Wendt, D. J. (2000). Pharmacology of the cardiac sodium channel. In *Cardiac Electrophysiology. From Cell to Bedside*, eds. Zipes, D. P. & Jalife, J., pp. 133-141. WB saunders Company.

Guo, D. & Lu, Z. (2000). Mechanism of IRK1 channel block by intracellular polyamines. *J Gen.Physiol* **115**, 799-814.

Guo, W., Li, H., London, B., & Nerbonne, J. M. (2000). Functional consequences of elimination of i(to,f) and i(to,s): early afterdepolarizations, atrioventricular block, and ventricular arrhythmias in mice lacking Kv1.4 and expressing a dominant-negative Kv4 alpha subunit. *Circ Res* **87**, 73-79.

Hagiwara, S., Kusano, K., & Saito, N. (1961). Membrane changes of Onchidium nerve cell in potassium-rich media. *J Physiol* **155**, 470-489.

Haissaguerre, M., Shah, D. C., Jais, P., Shoda, M., Kautzner, J., Arentz, T., Kalushe, D., Kadish, A., Griffith, M., Gaita, F., Yamane, T., Garrigue, S., Hocini, M., & Clementy, J. (2002). Role of Purkinje conducting system in triggering of idiopathic ventricular fibrillation. *Lancet* **359**, 677-678.

Han, W., Bao, W., Wang, Z., & Nattel, S. (2002a). Comparison of ion-channel subunit expression in canine cardiac Purkinje fibers and ventricular muscle. *Circ.Res.* **91**, 790-797.

Han, W., Barr, S. C., Pacioretty, L. M., & Gilmour, R. F., Jr. (1997). Restoration of the transient outward potassium current by noradrenaline in chagasic canine epicardium. *J.Physiol* **500 ( Pt 1)**, 75-83.

Han, W., Wang, Z., & Nattel, S. (2000). A comparison of transient outward currents in canine cardiac Purkinje cells and ventricular myocytes. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* **279**, H466-H474.

Han, W., Zhang, L., Schram, G., & Nattel, S. (2002b). Properties of potassium currents in Purkinje cells of failing human hearts. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* **283**, H2495-H2503.

Hancox, J. C., Levi, A. J., & Witchel, H. J. (1998). Time course and voltage dependence of expressed HERG current compared with native "rapid" delayed rectifier K current during the cardiac ventricular action potential. *Pflugers Arch.* **436**, 843-853.

Hancox, J. C. & Mitcheson, J. S. (1997). Ion channel and exchange currents in single myocytes isolated from the rabbit atrioventricular node. *Can.J Cardiol.* **13**, 1175-1182.

Haverkamp, W., Breithardt, G., Camm, A. J., Janse, M. J., Rosen, M. R., Antzelevitch, C., Escande, D., Franz, M., Malik, M., Moss, A., & Shah, R. (2000). The potential for QT prolongation and proarrhythmia by non-antiarrhythmic drugs: clinical and regulatory implications. Report on a policy conference of the European Society of Cardiology. *Eur.Heart J.* **21**, 1216-1231.

Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T., & MacKinnon, R. (1994). Mutations in the K<sup>+</sup> channel signature sequence. *Biophys.J.* **66**, 1061-1067.

Heinemann, S. H., Rettig, J., Wunder, F., & Pongs, O. (1995). Molecular and functional characterization of a rat brain Kv beta 3 potassium channel subunit. *FEBS Lett.* **377**, 383-389.

Hille, B. (2001). Introduction. In *Ion channels of excitable membranes*, ed. Hille, B., pp. 1-22. Sinauer Associates, Inc, Sunderland.

Hiraoka, M., Sawada, K., & Kawano, S. (1986). Effects of quinidine on plateau currents of guinea-pig ventricular myocytes. *J Mol.Cell Cardiol.* **18**, 1097-1106.

Hockerman, G. H., Johnson, B. D., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (1995). Molecular determinants of high affinity phenylalkylamine block of L-type calcium channels. *J Biol.Chem.* **270**, 22119-22122.

Hondeghem, L. M. & Roden, D. (2001). Agents used in cardiac arrhythmias. In *Basic and clinical pharmacology*, ed. Katzung, B. G., pp. 219-244. Lange medical books/McGraw-Hill.

Hondeghem, L. M. & Snyders, D. J. (1990). Class III antiarrhythmic agents have a lot of potential but a long way to go. Reduced effectiveness and dangers of reverse use dependence. *Circulation* **81**, 686-690.

Honore, E., Attali, B., Romey, G., Heurteaux, C., Ricard, P., Lesage, F., Lazdunski, M., & Barhanin, J. (1991). Cloning, expression, pharmacology and regulation of a delayed rectifier K<sup>+</sup> channel in mouse heart. *EMBO J.* **10**, 2805-2811.

Hoppe, U. C., Marban, E., & Johns, D. C. (2000). Molecular dissection of cardiac repolarization by in vivo Kv4.3 gene transfer. *J Clin. Invest* **105**, 1077-1084.

Hoshi, T., Zagotta, W. N., & Aldrich, R. W. (1990). Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science* **250**, 533-538.

Imaizumi, Y. & Giles, W. R. (1987). Quinidine-induced inhibition of transient outward current in cardiac muscle. *Am J Physiol* 1987 Sep;253(3 Pt 2):H704-8 H704-H788.

Inagaki, N., Gono, T., Clement, J. P., Namba, N., Inazawa, J., Gonzalez, G., Aguilar-Bryan, L., Seino, S., & Bryan, J. (1995). Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* **270**, 1166-1170.

Irisawa, H., Brown, H. F., & Giles, W. (1993). Cardiac pacemaking in the sinoatrial node. *Physiol Rev.* **73**, 197-227.

Isacoff, E. Y., Jan, Y. N., & Jan, L. Y. (1990). Evidence for the formation of heteromultimeric potassium channels in *Xenopus* oocytes. *Nature* **345**, 530-534.

Isacoff, E. Y., Jan, Y. N., & Jan, L. Y. (1991). Putative receptor for the cytoplasmic inactivation gate in the Shaker K<sup>+</sup> channel. *Nature* **353**, 86-90.

Isbrandt, D., Friederich, P., Solth, A., Haverkamp, W., Ebner, A., Borggrefe, M., Funke, H., Sauter, K., Breithardt, G., Pongs, O., & Schulze-Bahr, E. (2002). Identification and functional characterization of a novel KCNE2 (MiRP1) mutation that alters HERG channel kinetics. *J.Mol.Med.* **80**, 524-532.

Jahangir, A., Terzic, A., & Shen, W. (2003). Antiarrhythmic Drugs and Future Direction. In *Cardiac Repolarization. Bridging Basic and Clinical Science* pp. 387-404. Humana Press, Totowa, NJ.

Jerng, H. H. & Covarrubias, M. (1997). K<sup>+</sup> channel inactivation mediated by the concerted action of the cytoplasmic N- and C-terminal domains. *Biophys.J* **72**, 163-174.

Jerng, H. H., Shahidullah, M., & Covarrubias, M. (1999). Inactivation gating of Kv4 potassium channels: molecular interactions involving the inner vestibule of the pore. *J Gen.Physiol* **113**, 641-660.

Jiang, M., Cabo, C., Yao, J., Boyden, P. A., & Tseng, G. (2000). Delayed rectifier K currents have reduced amplitudes and altered kinetics in myocytes from infarcted canine ventricle. *Cardiovasc.Res* **48**, 34-43.

Jurkiewicz, N. K. & Sanguinetti, M. C. (1993). Rate-dependent prolongation of cardiac action potentials by a methanesulfonanilide class III antiarrhythmic agent. Specific block of rapidly activating delayed rectifier K<sup>+</sup> current by dofetilide. *Circ.Res.* **72**, 75-83.

Kaab, S., Dixon, J., Duc, J., Ashen, D., Nabauer, M., Beuckelmann, D. J., Steinbeck, G., McKinnon, D., & Tomaselli, G. F. (1998). Molecular basis of transient outward potassium current downregulation in human heart failure: a decrease in Kv4.3 mRNA correlates with a reduction in current density. *Circulation* **98**, 1383-1393.

Kaprielian, R., Wickenden, A. D., Kassiri, Z., Parker, T. G., Liu, P. P., & Backx, P. H. (1999). Relationship between K<sup>+</sup> channel down-regulation and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in rat ventricular myocytes following myocardial infarction. *J.Physiol* **517** ( Pt 1), 229-245.

Kassiri, Z., Zobel, C., Nguyen, T. T., Molkenin, J. D., & Backx, P. H. (2002). Reduction of I<sub>(to)</sub> causes hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes. *Circ Res* **90**, 578-585.

Katoh, H., Ogawa, S., Furuno, I., Sato, Y., Yoh, S., Saeki, K., & Nakamura, Y. (1990). Electrophysiologic effects of E-4031, a class III antiarrhythmic agent, on re-entrant ventricular arrhythmias in a canine 7-day-old myocardial infarction model. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **253**, 1077-1082.

Katz, A. M. (1992). Ion Channels of the Heart. In *Physiology of the Heart* pp. 415-437. Raven Press, New York.

Katz, A. M. (1993). Cardiac ion channels. *N.Engl.J.Med.* **328**, 1244-1251.

Katz, B. (1949). Les constantes électrique de la membrane du muscle. *Arch Sci Physiol* **2**, 285-299.

Kiehn, J., Lacerda, A. E., Wible, B., & Brown, A. M. (1996). Molecular physiology and pharmacology of HERG. Single-channel currents and block by dofetilide. *Circulation* **94**, 2572-2579.

Kim, E. & Sheng, M. (1996). Differential K<sup>+</sup> channel clustering activity of PSD-95 and SAP97, two related membrane-associated putative guanylate kinases. *Neuropharmacology* **35**, 993-1000.

Kleiman, R. B. & Houser, S. R. (1989). Outward currents in normal and hypertrophied feline ventricular myocytes. *Am J Physiol* **256**, H1450-H1461.

Kuo, H. C., Cheng, C. F., Clark, R. B., Lin, J. J., Lin, J. L., Hoshijima, M., Nguyen-Tran, V. T., Gu, Y., Ikeda, Y., Chu, P. H., Ross, J., Giles, W. R., & Chien, K. R. (2001). A defect in the Kv channel-interacting protein 2 (KChIP2) gene leads to a complete loss of I(to) and confers susceptibility to ventricular tachycardia. *Cell* **107**, 801-813.

Kupershmidt, S., Snyders, D. J., Raes, A., & Roden, D. M. (1998). A K<sup>+</sup> channel splice variant common in human heart lacks a C-terminal domain required for expression of rapidly activating delayed rectifier current. *J.Biol.Chem.* **273**, 27231-27235.

Kupershmidt, S., Yang, T., Anderson, M. E., Wessels, A., Niswender, K. D., Magnuson, M. A., & Roden, D. M. (1999). Replacement by homologous recombination of the minK gene with lacZ reveals restriction of minK expression to the mouse cardiac conduction system. *Circ.Res.* **84**, 146-152.

Kurokawa, J., Motoike, H. K., & Kass, R. S. (2001). TEA(+)-sensitive KCNQ1 constructs reveal pore-independent access to KCNE1 in assembled I(Ks) channels. *J.Gen.Physiol* **117**, 43-52.

Lee, J. K., Nishiyama, A., Kambe, F., Seo, H., Takeuchi, S., Kamiya, K., Kodama, I., & Toyama, J. (1999). Downregulation of voltage-gated K(+) channels in rat heart with right ventricular hypertrophy. *Am.J.Physiol* **277**, H1725-H1731.

Lesage, F., Attali, B., Lazdunski, M., & Barhanin, J. (1992). Developmental expression of voltage-sensitive K<sup>+</sup> channels in mouse skeletal muscle and C2C12 cells. *FEBS Lett.* **310**, 162-166.

Levy, D. I. & Deutsch, C. (1996). Recovery from C-type inactivation is modulated by extracellular potassium. *Biophys.J.* **70**, 798-805.

Lewis, A., McCrossan, Z. A., & Abbott, G. W. (2003). MinK, MiRP1 and MiRP2 diversify Kv3.1 and Kv3.2 potassium channel gating. *J Biol.Chem.*

Li, D., Zhang, L., Kneller, J., & Nattel, S. (2001). Potential ionic mechanism for repolarization differences between canine right and left atrium. *Circ.Res.* **88**, 1168-1175.

Li, G. R., Feng, J., Wang, Z., Fermini, B., & Nattel, S. (1996a). Adrenergic modulation of ultrarapid delayed rectifier K<sup>+</sup> current in human atrial myocytes. *Circ Res* **78**, 903-915.

Li, G. R., Feng, J., Yue, L., Carrier, M., & Nattel, S. (1996b). Evidence for two components of delayed rectifier K<sup>+</sup> current in human ventricular myocytes. *Circ Res* **78**, 689-696.

Li, M., Jan, Y. N., & Jan, L. Y. (1992). Specification of subunit assembly by the hydrophilic amino-terminal domain of the Shaker potassium channel. *Science* **257**, 1225-1230.

Litovsky, S. H. & Antzelevitch, C. (1988). Transient outward current prominent in canine ventricular epicardium but not endocardium. *Circ Res* **62**, 116-126.

Liu, D. W. & Antzelevitch, C. (1995). Characteristics of the delayed rectifier current (IKr and IKs) in canine ventricular epicardial, midmyocardial, and endocardial myocytes. A weaker IKs contributes to the longer action potential of the M cell. *Circ.Res.* **76**, 351-365.

Liu, D. W., Gintant, G. A., & Antzelevitch, C. (1993). Ionic bases for electrophysiological distinctions among epicardial, midmyocardial, and endocardial myocytes from the free wall of the canine left ventricle. *Circ.Res.* **72**, 671-687.

London, B., Trudeau, M. C., Newton, K. P., Beyer, A. K., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Satler, C. A., & Robertson, G. A. (1997). Two isoforms of the mouse ether-a-go-go-related gene coassemble to form channels with properties similar to the rapidly activating component of the cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> current. *Circ Res* **81**, 870-878.

Lopatin, A. N., Makhina, E. N., & Nichols, C. G. (1994). Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature* **372**, 366-369.

Lopatin, A. N., Makhina, E. N., & Nichols, C. G. (1995). The mechanism of inward rectification of potassium channels: "long-pore plugging" by cytoplasmic polyamines. *J Gen. Physiol* **106**, 923-955.

Lopatin, A. N. & Nichols, C. G. (2001). Inward rectifiers in the heart: an update on I(K1). *J.Mol.Cell Cardiol.* **33**, 625-638.

Lopez, G. A., Jan, Y. N., & Jan, L. Y. (1994). Evidence that the S6 segment of the Shaker voltage-gated K<sup>+</sup> channel comprises part of the pore. *Nature* **367**, 179-182.

Lopez-Barneo, J., Hoshi, T., Heinemann, S. H., & Aldrich, R. W. (1993). Effects of external cations and mutations in the pore region on C-type inactivation of Shaker potassium channels. *Receptors.Channels* **1**, 61-71.

Lu, Y.; Yue, L.; Wang, Z.; Nattel, S. (1998) Effects of the diuretic agent indapamide on Na<sup>+</sup>, transient outward, and delayed rectifier currents in canine atrial myocytes. *Circ Res* **83**, 158-166.

Ludwig, J., Owen, D., & Pongs, O. (1997). Carboxy-terminal domain mediates assembly of the voltage-gated rat ether-a-go-go potassium channel. *EMBO J.* **16**, 6337-6345.

Lue, W. M. & Boyden, P. A. (1992). Abnormal electrical properties of myocytes from chronically infarcted canine heart. Alterations in V<sub>max</sub> and the transient outward current. *Circulation* **85**, 1175-1188.

Lynch, J. J., Coskey, L. A., Montgomery, D. G., & Lucchesi, B. R. (1985). Prevention of ventricular fibrillation by dextrorotatory sotalol in a conscious canine model of sudden coronary death. *Am.Heart J.* **109**, 949-958.

Lynch, J. J., Jr., Heaney, L. A., Wallace, A. A., Gehret, J. R., Selnick, H. G., & Stein, R. B. (1990). Suppression of lethal ischemic ventricular arrhythmias by the class III agent E4031 in a canine model of previous myocardial infarction. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* **15**, 764-775.



Lynch, J. J., Jr., Houle, M. S., Stump, G. L., Wallace, A. A., Gilberto, D. B., Jahansouz, H., Smith, G. R., Tebben, A. J., Liverton, N. J., Selnick, H. G., Claremon, D. A., & Billman, G. E. (1999). Antiarrhythmic efficacy of selective blockade of the cardiac slowly activating delayed rectifier current, I(Ks), in canine models of malignant ischemic ventricular arrhythmia. *Circulation* **100**, 1917-1922.

Lynch, J. J., Jr., Wallace, A. A., Stupienski, R. F., III, Baskin, E. P., Beare, C. M., Appleby, S. D., Salata, J. J., Jurkiewicz, N. K., Sanguinetti, M. C., Stein, R. B., & . (1994). Cardiac electrophysiologic and antiarrhythmic actions of two long-acting spirobenzopyran piperidine class III agents, L-702,958 and L-706,000 [MK-499]. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **269**, 541-554.

MacKinnon, R. (1991). Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* **350**, 232-235.

MacKinnon, R., Heginbotham, L., & Abramson, T. (1990). Mapping the receptor site for charybdotoxin, a pore-blocking potassium channel inhibitor. *Neuron* **5**, 767-771.

MacKinnon, R. & Miller, C. (1988). Mechanism of charybdotoxin block of the high-conductance, Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel. *J.Gen.Physiol* **91**, 335-349.

Main, M. C., Bryant, S. M., & Hart, G. (1998). Regional differences in action potential characteristics and membrane currents of guinea-pig left ventricular myocytes. *Exp.Physiol* **83**, 747-761.

Majumder, K., De Biasi, M., Wang, Z., & Wible, B. A. (1995). Molecular cloning and functional expression of a novel potassium channel beta-subunit from human atrium. *FEBS Lett.* **361**, 13-16.

Marban, E. (1999). Heart failure: the electrophysiologic connection. *J.Cardiovasc.Electrophysiol.* **10**, 1425-1428.

Marban, E. (2002). Cardiac channelopathies. *Nature* **415**, 213-218.

Martin, R. L., Koumi, S., & Ten Eick, R. E. (1995). Comparison of the effects of internal [Mg<sup>2+</sup>] on IK1 in cat and guinea-pig cardiac ventricular myocytes. *J.Mol.Cell Cardiol.* **27**, 673-691.

Matsuda, H., Saigusa, A., & Irisawa, H. (1987). Ohmic conductance through the inwardly rectifying K channel and blocking by internal Mg<sup>2+</sup>. *Nature* **325**, 156-159.

Matsuda, T., Masumiya, H., Tanaka, N., Yamashita, T., Tsuruzoe, N., Tanaka, Y., Tanaka, H., & Shigenoba, K. (2001). Inhibition by a novel anti-arrhythmic agent, NIP-142, of cloned human cardiac K<sup>+</sup> channel Kv1.5 current. *Life Sci.* **68**, 2017-2024.

Mazhari, R., Nuss, H. B., Armoundas, A. A., Winslow, R. L., & Marban, E. (2002). Ectopic expression of KCNE3 accelerates cardiac repolarization and abbreviates the QT interval. *J.Clin.Invest* **109**, 1083-1090.

McDonald, T. V., Yu, Z., Ming, Z., Palma, E., Meyers, M. B., Wang, K. W., Goldstein, S. A., & Fishman, G. I. (1997). A minK-HERG complex regulates the cardiac potassium current I(Kr). *Nature* **388**, 289-292.

Melnyk, P., Zhang, L., Shrier, A., & Nattel, S. (2002). Differential distribution of Kir2.1 and Kir2.3 subunits in canine atrium and ventricle. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* **283**, H1123-H1133.

Miake, J., Marban, E., & Nuss, H. B. (2002). Biological pacemaker created by gene transfer. *Nature* **419**, 132-133.

Mitcheson, J. S. & Hancox, J. C. (1999). Characteristics of a transient outward current (sensitive to 4-aminopyridine) in Ca<sup>2+</sup>-tolerant myocytes isolated from the rabbit atrioventricular node. *Pflugers Arch.* **438**, 68-78.

Mitcheson, J. S. & Sanguinetti, M. C. (1999). Biophysical properties and molecular basis of cardiac rapid and slow delayed rectifier potassium channels. *Cell Physiol Biochem.* **9**, 201-216.

Mohler, P. J., Schott, J. J., Gramolini, A. O., Dilly, K. W., Guatimosim, S., duBell, W. H., Song, L. S., Haurogne, K., Kyndt, F., Ali, M. E., Rogers, T. B., Lederer, W. J., Escande, D., Le Marec, H., & Bennett, V. (2003). Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature* **421**, 634-639.

Moreno, I., Caballero, R., Gonzalez, T., Arias, C., Valenzuela, C., Iriepa, I., Galvez, E., Tamargo, J., Delpon, E. (2003). Effects of irbesartan on cloned potassium channels involved in human cardiac repolarization. *J. Pharmacol. Exp. Ther* **304**, 862-874.

Mycek, M. J., Harvey, R. A., & Champe, P. C. (1997). Antiarrhythmic drugs. In *Pharmacology*, eds. Mycek, M. J., Harvey, R. A., & Champe, P. C., pp. 163-174. Lippincott-Raven, Philadelphia.

Nabauer, M., Beuckelmann, D. J., Uberfuhr, P., & Steinbeck, G. (1996). Regional differences in current density and rate-dependent properties of the transient outward current in subepicardial and subendocardial myocytes of human left ventricle. *Circulation* **93**, 168-177.

Nakamura, T. Y., Artman, M., Rudy, B., & Coetzee, W. A. (1998). Inhibition of rat ventricular IK1 with antisense oligonucleotides targeted to Kir2.1 mRNA. *Am.J Physiol* **274**, H892-H900.

Nattel, S. (1999). Atrial electrophysiological remodeling caused by rapid atrial activation: underlying mechanisms and clinical relevance to atrial fibrillation. *Cardiovasc.Res* **42**, 298-308.

Nattel, S. (2003). Human genetics: Lost anchors cost lives. *Nature* **421**, 587, 589-587, 590.

Nattel, S. & Quantz, M. A. (1988). Pharmacological response of quinidine induced early afterdepolarisations in canine cardiac Purkinje fibres: insights into underlying ionic mechanisms. *Cardiovasc.Res.* **22**, 808-817.

Nattel, S., Yue, L., & Wang, Z. (1999). Cardiac Ultrarapid Delayed Rectifiers. a novel potassium current family of functional similarity and molecular diversity. *Cell Physiol Biochem.* **9**, 217-226.

Nerbonne, J. M. (2000). Molecular basis of functional voltage-gated K<sup>+</sup> channel diversity in the mammalian myocardium. *J.Physiol* **525 Pt 2**, 285-298.

Nerbonne, J. M. & Kass, R. S. (2003). Physiology and molecular biology of ion channels contributing to ventricular repolarisation. In *Cardiac repolarization. Bridging basic and clinical science*, eds. Gussak, I. & Antzelevitch, C., pp. 25-62. Humana press, Totowa, NJ.

Neyroud, N., Tesson, F., Denjoy, I., Leibovici, M., Donger, C., Barhanin, J., Faure, S., Gary, F., Coumel, P., Petit, C., Schwartz, K., & Guicheney, P. (1997). A novel mutation in the potassium channel gene KVLQT1 causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome. *Nat.Genet.* **15**, 186-189.

Nitta, J., Furukawa, T., Marumo, F., Sawanobori, T., & Hiraoka, M. (1994). Subcellular mechanism for Ca<sup>2+</sup>-dependent enhancement of delayed rectifier K<sup>+</sup> current in isolated membrane patches of guinea pig ventricular myocytes. *Circ Res* **74**, 96-104.

Ohya, S., Morohashi, Y., Muraki, K., Tomita, T., Watanabe, M., Iwatsubo, T., & Imaizumi, Y. (2001). Molecular cloning and expression of the novel splice variants of K(+) channel-interacting protein 2. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **282**, 96-102.

Oliva, C., Cohen, I. S., & Pennefather, P. (1990). The mechanism of rectification of iK1 in canine Purkinje myocytes. *J.Gen.Physiol* **96**, 299-318.

Oudit, G. Y., Kassiri, Z., Sah, R., Ramirez, R. J., Zobel, C., & Backx, P. H. (2001). The molecular physiology of the cardiac transient outward potassium current (I(to)) in normal and diseased myocardium. *J.Mol.Cell Cardiol.* **33**, 851-872.

Pacioretty, L. M., Cooper, B. J., & Gilmour, R. F., Jr. (1994). Reduction of the transient outward potassium current in canine X-linked muscular dystrophy. *Circulation* **90**, 1350-1356.

Pascual, J. M., Shieh, C. C., Kirsch, G. E., & Brown, A. M. (1995). Multiple residues specify external tetraethylammonium blockade in voltage-gated potassium channels. *Biophys.J.* **69**, 428-434.

Pereon, Y., Demolombe, S., Baro, I., Drouin, E., Charpentier, F., & Escande, D. (2000). Differential expression of KvLQT1 isoforms across the human ventricular wall. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* **278**, H1908-H1915.

Pike, G. K., Bretag, A. H., & Roberts, M. L. (1993). Modification of the transient outward current of rat atrial myocytes by metabolic inhibition and oxidant stress. *J.Physiol* **470**, 365-382.

Pond, A. L., Scheve, B. K., Benedict, A. T., Petrecca, K., Van Wagoner, D. R., Shrier, A., & Nerbonne, J. M. (2000). Expression of distinct ERG proteins in rat, mouse, and human heart. Relation To functional i(kr) channels [In Process Citation]. *J Biol.Chem.* **275**, 5997-6006.

Pongs, O. (1992). Molecular biology of voltage-dependent potassium channels. *Physiol Rev.* **72**, S69-S88.

Pourrier, M. & Nattel, S. (2004). Protéines d'ancrage et mort subite cardiaque: Comment et pourquoi? *Med Sci.* **20**, 437-441.

Pourrier, M., Schram, G., & Nattel, S. (2003). Properties, expression and potential roles of cardiac K<sup>+</sup> channel accessory subunits: MinK, MiRPs, KChIP, and KChAP. *J.Membr.Biol.* **194**, 141-152.

Pu, J., Wada, T., Valdivia, C., Chutkow, W. A., Burant, C. F., & Makielski, J. C. Evidence of KATP channels in native cardiac cells without SUR. *Biophys J* [80], 625-626. 2001.

Ref Type: Abstract

Ragsdale, D. S., McPhee, J. C., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (1996). Common molecular determinants of local anesthetic, antiarrhythmic, and anticonvulsant block of voltage-gated Na<sup>+</sup> channels. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **93**, 9270-9275.

Rasmussen, H. S., Allen, M. J., Blackburn, K. J., Butrous, G. S., & Dalrymple, H. W. (1992). Dofetilide, a novel class III antiarrhythmic agent. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* **20 Suppl 2**, S96-105.

Rasmusson, R. L., Morales, M. J., Castellino, R. C., Zhang, Y., Campbell, D. L., & Strauss, H. C. (1995). C-type inactivation controls recovery in a fast inactivating cardiac K<sup>+</sup> channel (Kv1.4) expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol (Lond)* **489 ( Pt 3)**, 709-721.

Rasmusson, R. L., Morales, M. J., Wang, S., Liu, S., Campbell, D. L., Brahmajothi, M. V., & Strauss, H. C. (1998). Inactivation of voltage-gated cardiac K<sup>+</sup> channels. *Circ.Res.* **82**, 739-750.

Rebois, R. V. & Hebert, T. E. (2003). Protein complexes involved in heptahelical receptor-mediated signal transduction. *Receptors.Channels* **9**, 169-194.

Roden, D. M., Thompson, K. A., Hoffman, B. F., & Woosley, R. L. (1986). Clinical features and basic mechanisms of quinidine-induced arrhythmias. *J Am Coll.Cardiol.* **8**, 73A-78A.

Rosati, B., Grau, F., Rodriguez, S., Li, H., Nerbonne, J. M., & McKinnon, D. (2003). Concordant expression of KCHIP2 mRNA, protein and transient outward current throughout the canine ventricle. *J.Physiol* **548**, 815-822.

Rosati, B., Pan, Z., Lypen, S., Wang, H. S., Cohen, I., Dixon, J. E., & McKinnon, D. (2001). Regulation of KCHIP2 potassium channel beta subunit gene expression underlies the gradient of transient outward current in canine and human ventricle. *J Physiol* **533**, 119-125.

Ruppertsberg, J. P., Frank, R., Pongs, O., & Stocker, M. (1991a). Cloned neuronal IK(A) channels reopen during recovery from inactivation. *Nature* **353**, 657-660.

Ruppersberg, J. P., Stocker, M., Pongs, O., Heinemann, S. H., Frank, R., & Koenen, M. (1991b). Regulation of fast inactivation of cloned mammalian IK(A) channels by cysteine oxidation. *Nature* **352**, 711-714.

Sager, P. T., Nademanee, K., Antimisiaris, M., Pacifico, A., Pruitt, C., Godfrey, R., & Singh, B. N. (1993). Antiarrhythmic effects of selective prolongation of refractoriness. Electrophysiologic actions of sematilide HCl in humans. *Circulation* **88**, 1072-1082.

Sakmann, B. & Trube, G. (1984). Conductance properties of single inwardly rectifying potassium channels in ventricular cells from guinea-pig heart. *J.Physiol* **347**, 641-657.

Sanguinetti, M. C., Curran, M. E., Zou, A., Shen, J., Spector, P. S., Atkinson, D. L., & Keating, M. T. (1996). Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel. *Nature* **384**, 80-83.

Sanguinetti, M. C., Jiang, C., Curran, M. E., & Keating, M. T. (1995). A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel. *Cell* **81**, 299-307.

Sanguinetti, M. C. & Jurkiewicz, N. K. (1990). Two components of cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *J.Gen.Physiol* **96**, 195-215.

Sanguinetti, M. C. & Jurkiewicz, N. K. (1991). Delayed rectifier outward K<sup>+</sup> current is composed of two currents in guinea pig atrial cells. *Am.J.Physiol* **260**, H393-H399.

Sanguinetti, M. C. & Jurkiewicz, N. K. (1992). Role of external Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> in gating of cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> currents. *Pflugers Arch.* **420**, 180-186.

Sanguinetti, M. C. & Tristani-Firouzi, M. (2000). Delayed and Inward Rectifier Potassium Channels. In *Cardiac Electrophysiology. From cell to bedside*, eds. Zipes, D. P. & Jalife, J., pp. 79-86. WB Saunders company, Philadelphia.

Sato, N., Tanaka, H., Habuchi, Y., & Giles, W. R. (2000). Electrophysiological effects of ibutilide on the delayed rectifier K(+) current in rabbit sinoatrial and atrioventricular node cells. *Eur.J Pharmacol.* **404**, 281-288.

Schonherr, R. & Heinemann, S. H. (1996). Molecular determinants for activation and inactivation of HERG, a human inward rectifier potassium channel. *J Physiol (Lond)* **493** ( Pt 3), 635-642.

Schram, G., Melnyk, P., Pourrier, M., Wang, Z., & Nattel, S. (2002a). Kir2.4 and Kir2.1 K(+) channel subunits co-assemble: a potential new contributor to inward rectifier current heterogeneity. *J.Physiol* **544**, 337-349.

Schram, G., Pourrier, M., Melnyk, P., & Nattel, S. (2002b). Differential distribution of cardiac ion channel expression as a basis for regional specialization in electrical function. *Circ.Res.* **90**, 939-950.

Schram, G., Pourrier, M., Wang, Z., White, M., & Nattel, S. (2003). Barium block of Kir2 and human cardiac inward rectifier currents: evidence for subunit-heteromeric contribution to native currents. *Cardiovasc.Res* **59**, 328-338.

Schroeder, B. C., Waldegger, S., Fehr, S., Bleich, M., Warth, R., Greger, R., & Jentsch, T. J. (2000). A constitutively open potassium channel formed by KCNQ1 and KCNE3. *Nature* **403**, 196-199.

Schultz, J. H., Volk, T., & Ehmke, H. (2001). Heterogeneity of Kv2.1 mRNA expression and delayed rectifier current in single isolated myocytes from rat left ventricle. *Circ Res* **88**, 483-490.

Schulze-Bahr, E., Wang, Q., Wedekind, H., Haverkamp, W., Chen, Q., Sun, Y., Rubie, C., Hordt, M., Towbin, J. A., Borggrefe, M., Assmann, G., Qu, X., Somberg, J. C., Breithardt, G., Oberti, C., & Funke, H. (1997). KCNE1 mutations cause jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Nat.Genet.* **17**, 267-268.

Schwartz, P. J. & Wolf, S. (1978). QT interval prolongation as predictor of sudden death in patients with myocardial infarction. *Circulation* **57**, 1074-1077.

Selnick, H. G., Liverton, N. J., Baldwin, J. J., Butcher, J. W., Claremon, D. A., Elliott, J. M., Freidinger, R. M., King, S. A., Libby, B. E., McIntyre, C. J., Pribush, D. A., Remy, D. C., Smith, G. R., Tebben, A. J., Jurkiewicz, N. K., Lynch, J. J., Salata, J. J., Sanguinetti, M. C., Siegl, P. K., Slaughter, D. E., & Vyas, K. (1997). Class III antiarrhythmic activity in vivo by selective blockade of the slowly activating cardiac delayed rectifier potassium current IKs by (R)-2-(2,4-trifluoromethyl)-N-[2-oxo-5-phenyl-1-(2,2,2-trifluoroethyl)- 2, 3-dihydro-1H-benzo[e][1,4]diazepin-3-yl]acetamide. *J.Med.Chem.* **40**, 3865-3868.

Shen, N. V., Chen, X., Boyer, M. M., & Pfaffinger, P. J. (1993). Deletion analysis of K<sup>+</sup> channel assembly. *Neuron* **11**, 67-76.

Sheng, M., Tsaur, M. L., Jan, Y. N., & Jan, L. Y. (1992). Subcellular segregation of two A-type K<sup>+</sup> channel proteins in rat central neurons. *Neuron* **9**, 271-284.

Shibata, R., Misonou, H., Campomanes, C. R., Anderson, A. E., Schrader, L. A., Doliveira, L. C., Carroll, K. I., Sweatt, J. D., Rhodes, K. J., & Trimmer, J. S. (2003). A fundamental role for KChIPs in determining the molecular properties and trafficking of Kv4.2 potassium channels. *J Biol.Chem.* **278**, 36445-36454.

Shieh, C. C., Coghlan, M., Sullivan, J. P., & Gopalakrishnan, M. (2000). Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacol.Rev.* **52**, 557-594.

Shieh, C. C. & Kirsch, G. E. (1994). Mutational analysis of ion conduction and drug binding sites in the inner mouth of voltage-gated K<sup>+</sup> channels. *Biophys.J.* **67**, 2316-2325.

Shimoni, Y., Fiset, C., Clark, R.B., Dixon, J.E., McKinnon, D., Giles, W.R. (1997). Thyroid hormone regulates postnatal expression of transient K<sup>+</sup> channel isoforms in rat ventricle. *J. Physiol (London)* **500 (Pt 1)**, 65-73.

Shimoni, Y. (1999). Hormonal control of cardiac ion channels and transporters. *Prog.Biophys Mol.Biol.* **72**, 67-108.

Shimoni, Y., Banno, H., & Clark, R. B. (1992). Hyperthyroidism selectively modified a transient potassium current in rabbit ventricular and atrial myocytes. *J.Physiol* **457**, 369-389.

Slawsky, M. T. & Castle, N. A. (1994). K<sup>+</sup> channel blocking actions of flecainide compared with those of propafenone and quinidine in adult rat ventricular myocytes. *J Pharmacol.Exp.Ther.* **269**, 66-74.

Smith, P. L., Baukrowitz, T., & Yellen, G. (1996). The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel [see comments]. *Nature* **379**, 833-836.

Snyders, D. J. (1999). Structure and function of cardiac potassium channels. *Cardiovasc.Res* **42**, 377-390.



Snyders, J., Knoth, K. M., Roberds, S. L., & Tamkun, M. M. (1992). Time-, voltage-, and state-dependent block by quinidine of a cloned human cardiac potassium channel. *Mol.Pharmacol.* **41**, 322-330.

Spector, P. S., Curran, M. E., Zou, A., Keating, M. T., & Sanguinetti, M. C. (1996). Fast inactivation causes rectification of the IKr channel. *J Gen.Physiol* **107**, 611-619.

Splawski, I., Timothy, K. W., Vincent, G. M., Atkinson, D. L., & Keating, M. T. (1997a). Molecular basis of the long-QT syndrome associated with deafness. *N.Engl.J Med.* **336**, 1562-1567.

Splawski, I., Tristani-Firouzi, M., Lehmann, M. H., Sanguinetti, M. C., & Keating, M. T. (1997b). Mutations in the hminK gene cause long QT syndrome and suppress IKs function. *Nat.Genet.* **17**, 338-340.

Suzuki, M., Li, R. A., Miki, T., Uemura, H., Sakamoto, N., Ohmoto-Sekine, Y., Tamagawa, M., Ogura, T., Seino, S., Marban, E., & Nakaya, H. (2001). Functional roles of cardiac and vascular ATP-sensitive potassium channels clarified by Kir6.2-knockout mice. *Circ Res* **88**, 570-577.

Tai, K. K. & Goldstein, S. A. (1998). The conduction pore of a cardiac potassium channel. *Nature* **391**, 605-608.

Takimoto, K., Li, D., Hershman, K. M., Li, P., Jackson, E. K., & Levitan, E. S. (1997). Decreased expression of Kv4.2 and novel Kv4.3 K<sup>+</sup> channel subunit mRNAs in ventricles of renovascular hypertensive rats. *Circ Res* **81**, 533-539.

Takimoto, K., Yangi, E. K., & Conforti, L. (2002). Palmitoylation of KChIP splicing variants is required for efficient cell surface expression of Kv4.3 channels. *J.Biol.Chem.* **277**, 26904-26911.

Ten Eick, R. E., Zhang, K., Harvey, R. D., & Bassett, A. L. (1993). Enhanced functional expression of transient outward current in hypertrophied feline myocytes. *Cardiovasc.Drugs Ther.* **7 Suppl 3**, 611-619.

Tinel, N., Diochot, S., Borsotto, M., Lazdunski, M., & Barhanin, J. (2000). KCNE2 confers background current characteristics to the cardiac KCNQ1 potassium channel. *EMBO J.* **19**, 6326-6330.

Snyders, J., Knoth, K. M., Roberds, S. L., & Tamkun, M. M. (1992). Time-, voltage-, and state-dependent block by quinidine of a cloned human cardiac potassium channel. *Mol.Pharmacol.* **41**, 322-330.

Spector, P. S., Curran, M. E., Zou, A., Keating, M. T., & Sanguinetti, M. C. (1996). Fast inactivation causes rectification of the IKr channel. *J Gen.Physiol* **107**, 611-619.

Splawski, I., Timothy, K. W., Vincent, G. M., Atkinson, D. L., & Keating, M. T. (1997a). Molecular basis of the long-QT syndrome associated with deafness. *N.Engl.J Med.* **336**, 1562-1567.

Splawski, I., Tristani-Firouzi, M., Lehmann, M. H., Sanguinetti, M. C., & Keating, M. T. (1997b). Mutations in the hminK gene cause long QT syndrome and suppress IKs function. *Nat.Genet.* **17**, 338-340.

Suzuki, M., Li, R. A., Miki, T., Uemura, H., Sakamoto, N., Ohmoto-Sekine, Y., Tamagawa, M., Ogura, T., Seino, S., Marban, E., & Nakaya, H. (2001). Functional roles of cardiac and vascular ATP-sensitive potassium channels clarified by Kir6.2-knockout mice. *Circ Res* **88**, 570-577.

Tai, K. K. & Goldstein, S. A. (1998). The conduction pore of a cardiac potassium channel. *Nature* **391**, 605-608.

Takimoto, K., Li, D., Hershman, K. M., Li, P., Jackson, E. K., & Levitan, E. S. (1997). Decreased expression of Kv4.2 and novel Kv4.3 K<sup>+</sup> channel subunit mRNAs in ventricles of renovascular hypertensive rats. *Circ Res* **81**, 533-539.

Takimoto, K., Yangi, E. K., & Conforti, L. (2002). Palmitoylation of KChIP splicing variants is required for efficient cell surface expression of Kv4.3 channels. *J.Biol.Chem.* **277**, 26904-26911.

Ten Eick, R. E., Zhang, K., Harvey, R. D., & Bassett, A. L. (1993). Enhanced functional expression of transient outward current in hypertrophied feline myocytes. *Cardiovasc.Drugs Ther.* **7 Suppl 3**, 611-619.

Tinel, N., Diochot, S., Borsotto, M., Lazdunski, M., & Barhanin, J. (2000). KCNE2 confers background current characteristics to the cardiac KCNQ1 potassium channel. *EMBO J.* **19**, 6326-6330.

Tinker, A., Jan, Y. N., & Jan, L. Y. (1996). Regions responsible for the assembly of inwardly rectifying potassium channels. *Cell* **87**, 857-868.

Traebert, M., Dumotier, B., Meister, L., Hoffmann, P., Dominguez-Estevéz, M., Suter, W. (2004). Inhibition of hERG K<sup>+</sup> currents by antimalarial drugs in stably transfected HEK293 cells. *Eur. J. Pharmacol.* **484**, 41-48.

Trudeau, M. C., Warmke, J. W., Ganetzky, B., & Robertson, G. A. (1995). HERG, a human inward rectifier in the voltage-gated potassium channel family. *Science* **269**, 92-95.

Tseng, G. N. (1999). Different state dependencies of 4-aminopyridine binding to rKv1.4 and rKv4.2: role of the cytoplasmic halves of the fifth and sixth transmembrane segments. *J Pharmacol. Exp. Ther.* **290**, 569-577.

Tseng, G. N. (2001). I(Kr): the hERG channel. *J Mol. Cell Cardiol.* **33**, 835-849.

Tseng-Crank, J., Yao, J. A., Berman, M. F., & Tseng, G. N. (1993). Functional role of the NH<sub>2</sub>-terminal cytoplasmic domain of a mammalian A-type K channel. *J. Gen. Physiol.* **102**, 1057-1083.

Van Gelder, I. C., Hagens, V. E., Bosker, H. A., Kingma, J. H., Kamp, O., Kingma, T., Said, S. A., Darmanata, J. I., Timmermans, A. J., Tijssen, J. G., & Crijns, H. J. (2002). A comparison of rate control and rhythm control in patients with recurrent persistent atrial fibrillation. *N. Engl. J. Med.* **347**, 1834-1840.

Van Wagoner, D. R., Pond, A. L., McCarthy, P. M., Trimmer, J. S., & Nerbonne, J. M. (1997). Outward K<sup>+</sup> current densities and Kv1.5 expression are reduced in chronic human atrial fibrillation. *Circ Res* **80**, 772-781.

Vanhoutte, F., Vereecke, J., Carmeliet, E., & Verbeke, N. (1991). Effects of the enantiomers of flecainide on action potential characteristics in the guinea-pig papillary muscle. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **310**, 102-115.

Varro, A., Balati, B., Iost, N., Takacs, J., Virag, L., Lathrop, D. A., Csaba, L., Talosi, L., & Papp, J. G. (2000). The role of the delayed rectifier component IKs in dog ventricular muscle and Purkinje fibre repolarization. *J. Physiol.* **523 Pt 1**, 67-81.

Veldkamp, M. W., van Ginneken, A. C., & Bouman, L. N. (1993). Single delayed rectifier channels in the membrane of rabbit ventricular myocytes. *Circ Res* **72**, 865-878.

Volders, P. G., Stengl, M., van Opstal, J. M., Gerlach, U., Spatjens, R. L., Beekman, J. D., Sipido, K. R., & Vos, M. A. (2003). Probing the contribution of IKs to canine ventricular repolarization: key role for beta-adrenergic receptor stimulation. *Circulation* **107**, 2753-2760.

Waldo, A. L., Camm, A. J., deRuyter, H., Friedman, P. L., MacNeil, D. J., Pauls, J. F., Pitt, B., Pratt, C. M., Schwartz, P. J., & Veltri, E. P. (1996). Effect of d-sotalol on mortality in patients with left ventricular dysfunction after recent and remote myocardial infarction. The SWORD Investigators. Survival With Oral d-Sotalol. *Lancet* **348**, 7-12.

Walker, B.D., Singleton, C.B., Bursill, J.A., Wyse, K.R., Valenzuela, S.M., Qiu, M.R., Breit, S.N., Campbell, T.J. (1999). Inhibition of the human ether-a-go-go-related gene (HERG) potassium channel by cisapride: affinity for open and inactivated states. *Br. J. Pharmacol.* **128**, 444-450.

Wang, D. W., Yazawa, K., Makita, N., George, A. L., Jr., & Bennett, P. B. (1997a). Pharmacological targeting of long QT mutant sodium channels. *J.Clin.Invest* **99**, 1714-1720.

Wang, L., Duff, H.J. (1996a). Identification and characteristics of delayed rectifier K<sup>+</sup> current in fetal mouse ventricular myocytes. *Am.J. Physiol* **270**, H2088-H2093.

Wang, Q., Curran, M. E., Splawski, I., Burn, T. C., Millholland, J. M., VanRaay, T. J., Shen, J., Timothy, K. W., Vincent, G. M., de Jager, T., Schwartz, P. J., Toubin, J. A., Moss, A. J., Atkinson, D. L., Landes, G. M., Connors, T. D., & Keating, M. T. (1996a). Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat.Genet.* **12**, 17-23.

Wang, S., Liu, S., Morales, M. J., Strauss, H. C., & Rasmusson, R. L. (1997b). A quantitative analysis of the activation and inactivation kinetics of HERG expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol (Lond)* **502** ( Pt 1), 45-60.

Wang, S., Morales, M. J., Liu, S., Strauss, H. C., & Rasmusson, R. L. (1996b). Time, voltage and ionic concentration dependence of rectification of h-erg expressed in *Xenopus* oocytes. *FEBS Lett.* **389**, 167-173.

Wang, S., Patel, S. P., Qu, Y., Hua, P., Strauss, H. C., & Morales, M. J. (2002). Kinetic properties of Kv4.3 and their modulation by KChIP2b. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **295**, 223-229.

Wang, Z., Feng, J., Shi, H., Pond, A., Nerbonne, J. M., & Nattel, S. (1999). Potential molecular basis of different physiological properties of the transient outward K<sup>+</sup> current in rabbit and human atrial myocytes. *Circ.Res.* **84**, 551-561.

Wang, Z., Fermini, B., & Nattel, S. (1993a). Delayed rectifier outward current and repolarization in human atrial myocytes. *Circ Res* **73**, 276-285.

Wang, Z., Fermini, B., & Nattel, S. (1993b). Sustained depolarization-induced outward current in human atrial myocytes. Evidence for a novel delayed rectifier K<sup>+</sup> current similar to Kv1.5 cloned channel currents. *Circ Res* **73**, 1061-1076.

Wang, Z., Fermini, B., & Nattel, S. (1994). Rapid and slow components of delayed rectifier current in human atrial myocytes. *Cardiovasc.Res* **28**, 1540-1546.

Wang, Z., Fermini, B., & Nattel, S. (1995). Effects of flecainide, quinidine, and 4-aminopyridine on transient outward and ultrarapid delayed rectifier currents in human atrial myocytes. *J Pharmacol.Exp.Ther.* **272**, 184-196.

Wang, Z., Yue, L., White, M., Pelletier, G., & Nattel, S. (1998). Differential distribution of inward rectifier potassium channel transcripts in human atrium versus ventricle. *Circulation* **98**, 2422-2428.

Weerapura, M., Nattel, S., Chartier, D., Caballero, R., & Hebert, T. E. (2002). A comparison of currents carried by HERG, with and without coexpression of MiRP1, and the native rapid delayed rectifier current. Is MiRP1 the missing link? *J.Physiol* **540**, 15-27.

Wettwer, E., Amos, G. J., Posival, H., & Ravens, U. (1994). Transient outward current in human ventricular myocytes of subepicardial and subendocardial origin. *Circ.Res.* **75**, 473-482.

Wickenden, A. D. (2002). K<sup>+</sup> channels as therapeutic drug targets. *Pharmacology and Therapeutics* 157-182.

Wickenden, A. D., Jegla, T. J., Kaprielian, R., & Backx, P. H. (1999). Regional contributions of Kv1.4, Kv4.2, and Kv4.3 to transient outward K<sup>+</sup> current in rat ventricle. *Am.J.Physiol* **276**, H1599-H1607.

Wymore, R. S., Gintant, G. A., Wymore, R. T., Dixon, J. E., McKinnon, D., & Cohen, I. S. (1997). Tissue and species distribution of mRNA for the IKr-like K<sup>+</sup> channel, erg. *Circ.Res.* **80**, 261-268.

Wyse, D. G., Waldo, A. L., DiMarco, J. P., Domanski, M. J., Rosenberg, Y., Schron, E. B., Kellen, J. C., Greene, H. L., Mickel, M. C., Dalquist, J. E., & Corley, S. D. (2002). A comparison of rate control and rhythm control in patients with atrial fibrillation. *N.Engl.J Med.* **347**, 1825-1833.

Xu, H., Guo, W., & Nerbonne, J. M. (1999a). Four kinetically distinct depolarization-activated K<sup>+</sup> currents in adult mouse ventricular myocytes. *J Gen.Physiol* **113**, 661-678.

Xu, H., Li, H., & Nerbonne, J. M. (1999b). Elimination of the transient outward current and action potential prolongation in mouse atrial myocytes expressing a dominant negative Kv4 alpha subunit. *J Physiol (Lond)* **519 Pt 1**, 11-21.

Xu, J., Yu, W., Jan, Y. N., Jan, L. Y., & Li, M. (1995). Assembly of voltage-gated potassium channels. Conserved hydrophilic motifs determine subfamily-specific interactions between the alpha- subunits. *J.Biol.Chem.* **270**, 24761-24768.

Yang, J., Jan, Y. N., & Jan, L. Y. (1995a). Control of rectification and permeation by residues in two distinct domains in an inward rectifier K<sup>+</sup> channel. *Neuron* **14**, 1047-1054.

Yang, T., Kupersmidt, S., & Roden, D. M. (1995b). Anti-minK antisense decreases the amplitude of the rapidly activating cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> current. *Circ.Res.* **77**, 1246-1253.

Yang, T., Snyders, D. J., & Roden, D. M. (1995c). Ibutilide, a methanesulfonanilide antiarrhythmic, is a potent blocker of the rapidly activating delayed rectifier K<sup>+</sup> current (IKr) in AT-1 cells. Concentration-, time-, voltage-, and use-dependent effects. *Circulation* **91**, 1799-1806.

Yellen, G. (2002). The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature* **419**, 35-42.

Yellen, G., Sodickson, D., Chen, T. Y., & Jurman, M. E. (1994). An engineered cysteine in the external mouth of a K<sup>+</sup> channel allows inactivation to be modulated by metal binding. *Biophys J* **66**, 1068-1075.

Yeola, S. W., Rich, T. C., Uebele, V. N., Tamkun, M. M., & Snyders, D. J. (1996). Molecular analysis of a binding site for quinidine in a human cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> channel. Role of S6 in antiarrhythmic drug binding. *Circ Res* **78**, 1105-1114.

Yeola, S. W. & Snyders, D. J. (1997). Electrophysiological and pharmacological correspondence between Kv4.2 current and rat cardiac transient outward current. *Cardiovasc.Res* **33**, 540-547.

Yu, H., Gao, J., Wang, H., Wymore, R., Steinberg, S., McKinnon, D., Rosen, M. R., & Cohen, I. S. (2000). Effects of the renin-angiotensin system on the current I<sub>(to)</sub> in epicardial and endocardial ventricular myocytes from the canine heart. *Circ Res* **86**, 1062-1068.

Yu, H., Wu, J., Potapova, I., Wymore, R. T., Holmes, B., Zuckerman, J., Pan, Z., Wang, H., Shi, W., Robinson, R. B., El Maghrabi, M. R., Benjamin, W., Dixon, J., McKinnon, D., Cohen, I. S., & Wymore, R. (2001). MinK-related peptide 1: A beta subunit for the HCN ion channel subunit family enhances expression and speeds activation. *Circ.Res.* **88**, E84-E87.

Yu, W., Xu, J., & Li, M. (1996). NAB domain is essential for the subunit assembly of both alpha-alpha and alpha-beta complexes of shaker-like potassium channels. *Neuron* **16**, 441-453.

Yue, D. T. & Marban, E. (1988). A novel cardiac potassium channel that is active and conductive at depolarized potentials. *Pflugers Arch.* **413**, 127-133.

Yue, L., Feng, J., Gaspo, R., Li, G. R., Wang, Z., & Nattel, S. (1997). Ionic remodeling underlying action potential changes in a canine model of atrial fibrillation. *Circ.Res.* **81**, 512-525.

Yue, L., Feng, J., Li, G. R., & Nattel, S. (1996a). Characterization of an ultrarapid delayed rectifier potassium channel involved in canine atrial repolarization. *J.Physiol* **496 ( Pt 3)**, 647-662.

Yue, L., Feng, J., Li, G. R., & Nattel, S. (1996b). Transient outward and delayed rectifier currents in canine atrium: properties and role of isolation methods. *Am.J.Physiol* **270**, H2157-H2168.

Yue, L., Melnyk, P., Gaspo, R., Wang, Z., & Nattel, S. (1999). Molecular mechanisms underlying ionic remodeling in a dog model of atrial fibrillation. *Circ Res* **84**, 776-784.

Yue, L., Wang, Z., Rindt, H., & Nattel, S. (2000). Molecular evidence for a role of Shaw (Kv3) potassium channel subunits in potassium currents of dog atrium. *J.Physiol* **527 Pt 3**, 467-478.

Zagotta, W. N., Hoshi, T., & Aldrich, R. W. (1990). Restoration of inactivation in mutants of Shaker potassium channels by a peptide derived from ShB [see comments]. *Science* **250**, 568-571.

Zareba, W. & Moss, A. J. (2003). QT interval and its drug-induced prolongation. In *Cardiac repolarization: Bridging basic and clinical science*, eds. Gussak, I. & Antzelevitch, C., pp. 311-328. Humana Press, Totowa.

Zaritsky, J. J., Redell, J. B., Tempel, B. L., & Schwarz, T. L. (2001). The consequences of disrupting cardiac inwardly rectifying K(+) current (I(K1)) as revealed by the targeted deletion of the murine Kir2.1 and Kir2.2 genes. *J.Physiol* **533**, 697-710.

Zeng, J., Laurita, K. R., Rosenbaum, D. S., & Rudy, Y. (1995). Two components of the delayed rectifier K<sup>+</sup> current in ventricular myocytes of the guinea pig type. Theoretical formulation and their role in repolarization. *Circ Res* **77**, 140-152.

Zhang, H., Zhu, B., Yao, J. A., & Tseng, G. N. (1998). Differential effects of S6 mutations on binding of quinidine and 4-aminopyridine to rat isoform of Kv1.4: common site but different factors in determining blockers' binding affinity. *J Pharmacol.Exp.Ther.* **287**, 332-343.

Zhang, M., Jiang, M., & Tseng, G. N. (2001a). minK-related peptide 1 associates with Kv4.2 and modulates its gating function: potential role as beta subunit of cardiac transient outward channel? *Circ.Res.* **88**, 1012-1019.

Zhang, T. T., Takimoto, K., Stewart, A. F., Zhu, C., & Levitan, E. S. (2001b). Independent regulation of cardiac Kv4.3 potassium channel expression by angiotensin II and phenylephrine. *Circ Res* **88**, 476-482.

Zhou, Z., Gong, Q., Ye, B., Fan, Z., Makielski, J. C., Robertson, G. A., & January, C. T. (1998). Properties of HERG channels stably expressed in HEK 293 cells studied at physiological temperature. *Biophys J* **74**, 230-241.



Zhu, X. R., Wulf, A., Schwarz, M., Isbrandt, D., & Pongs, O. (1999). Characterization of human Kv4.2 mediating a rapidly-inactivating transient voltage-sensitive K<sup>+</sup> current. *Receptors.Channels* **6**, 387-400.

Zipes, D. P. (1997). Atrial fibrillation: a review of pathophysiology. *Semin.Interv.Cardiol.* **2**, 203-213.

Zou, A., Curran, M. E., Keating, M. T., & Sanguinetti, M. C. (1997). Single HERG delayed rectifier K<sup>+</sup> channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Am.J.Physiol* **272**, H1309-H1314.