

Université de Montréal

**Études de type structure fonction du couplage électromécanique et de
la coopérativité sous-unitaire chez les canaux potassiques dépendants
du voltage**

par

Georges Anthony Haddad

Département de Physique

Faculté des arts et sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès Sciences

en physique

option biophysique et physiologie moléculaire

Décembre 2010

© Georges Anthony Haddad 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Études de type structure fonction du couplage électromécanique et de
la coopérativité sous-unitaire chez les canaux potassiques dépendants
du voltage**

Présenté par :
Georges Anthony Haddad

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Jean-Yves Lapointe, président-rapporteur

Dr. Rikard Blunck, directeur de recherche

Dr. Rémy Sauvé, membre du jury

Résumé

Les canaux potassiques voltage-dépendants forment des tétramères dont chaque sous-unité comporte six segments transmembranaires (S1 à S6). Le pore, formé des segments S5-S6 de chaque sous-unité, est entouré de quatre domaines responsables de la sensibilité au potentiel membranaire, les senseurs de voltage (VS; S1-S4). Lors d'une dépolarisation membranaire, le mouvement des résidus chargés situés dans le VS entraîne un mouvement de charges détectable en électrophysiologie, le courant de « gating ». L'activation du VS conduit à l'ouverture du pore, qui se traduit par un changement de conformation en C-terminal du segment S6. Pour élucider les principes qui sous-tendent le couplage électromécanique entre ces deux domaines, nous avons étudié deux régions présumées responsables du couplage chez les canaux de type Shaker K⁺, soit la région carboxy-terminale du segment S6 et le lien peptidique reliant les segments transmembranaire S4-S5 (S4-5L). Avec la technique du « cut-open voltage clamp fluorometry » (COVCF), nous avons pu déterminer que l'interaction inter-sous-unitaire RELY, formée par des acides aminés situés sur le lien S4-5L et S6 de deux sous-unités voisines, est impliquée dans le développement de la composante lente observée lors du retour des charges de « gating » vers leur état de repos, le « OFF-gating ». Nous avons observé que l'introduction de mutations dans la région RELY module la force de ces interactions moléculaires et élimine l'asymétrie observée dans les courants de « gating » de type sauvage. D'ailleurs, nous démontrons que ce couplage inter-sous-unitaire est responsable de la stabilisation du pore dans l'état ouvert. Nous avons également identifié une interaction intra-sous-unitaire entre les résidus I384 situé sur le lien S4-5L et F484 sur le segment S6 d'une même sous-unité. La déstabilisation de cette interaction hydrophobique découple complètement le mouvement des senseurs de voltage et l'ouverture du pore. Sans cette interaction, l'énergie nécessaire pour activer les VS est moindre en raison de l'absence du poids mécanique appliqué par le pore. De plus, l'abolition du couplage électromécanique élimine également le « mode shift », soit le déplacement de la dépendance au voltage des charges de transfert (QV) vers des potentiels hyperpolarisants. Ceci indique que le poids mécanique du pore imposé au VS entraîne le « mode shift », en modulant la conformation intrinsèque du VS par un processus allostérique.

Mots-clés: Canaux potassiques voltage-dépendants, courant de « gating », de couplage électromécanique, coopérativité, « mode shift », « cut-open voltage-clamp fluorometry »

Abstract

Voltage-gated potassium channels are tetramers and each subunit is formed of six transmembrane segments (S1 to S6). The pore, formed by the S5-S6 segments of each subunit, is surrounded by four modules responsible for sensitivity to the membrane potential, the voltage sensors (VS, S1-S4). During membrane depolarization, the movement of charged residues located in the VS causes a detectable charge movement called the gating current. The activation of the VS led to the opening of the pore, resulting in a conformational change in the C-terminal segment of S6. To elucidate the principles underlying the electromechanical coupling between these two domains, we examined two regions presumed responsible for the coupling among channels of the Shaker K⁺ family: the carboxy-terminal region of S6 and the peptide bond linking the transmembrane segments S4-S5 (S4-5L). Using the cut-open voltage clamp fluorometry (COVCF), we have determined that the RELY inter-subunit interaction, formed by amino acids located on the S4-5L linker and S6 of two neighboring subunits, is involved in the development of the slow component observed during the return of the gating charges (OFF-gating) to their resting state. The introduction of mutations in the RELY region modulates the strength of these molecular interactions and eliminates the asymmetry observed in the wild type gating currents. Moreover, we demonstrate that this inter-subunit coupling is responsible for stabilizing the pore in the open state. We have also identified an intra-subunit interaction between residues I384 located on the S4-5L linker and F484 on the S6 segment of the same subunit. The destabilization of this hydrophobic interaction uncouples completely the movement of voltage sensors from pore opening. Without this interaction, the energy required to activate the VS is diminished due to the absence of mechanical weight applied by the pore. Furthermore, this uncoupling also eliminates the "mode shift", defined as an amplified shift of the voltage dependence of gating charge (QV) to hyperpolarizing potentials during prolonged depolarization, thus indicating that the mechanical load of the pore influences the entry of the VS into this shifted mode by modulating the conformation of the VS through an intrinsic allosteric process.

Keywords: Voltage-gated potassium channels, gating, electromechanical coupling, cooperativity, mode shift, Voltage-clamp fluorometry

Tables des matières

1. Introduction.....	1
1.1. Les canaux potassiques	3
1.1.1. La fonction des canaux potassiques	4
1.1.2. Classification topologique et homologie structurale.....	5
1.1.3. La structure du pore et ses propriétés.....	7
1.1.3.1. L'ouverture du pore	11
1.1.4. Le senseur de voltage	12
1.1.4.1. La famille des Kv et leur homologie.....	12
1.1.4.2. La diversité des senseurs de voltage et leur motif conservé	14
1.1.5. La structure et les propriétés fonctionnelles des canaux Kv.....	16
1.1.5.1. Shaker K ⁺ de la drosophile melanogaster.....	16
1.1.5.2. Caractéristique de la structure cristalline Kv1.2	19
1.1.5.3. La localisation du champ électrique.....	24
1.1.5.4. Les modèles conceptuels.....	25
1.2. Les propriétés biophysiques des canaux potassiques.....	28
1.3. Le mécanisme de « gating » et son modèle cinétique	32
1.3.1. Le modèle de Markov	32
1.3.2. Les caractéristiques cinétiques et énergétiques du « gating ».....	34
1.4. Le couplage électromécanique.....	38
1.4.1. Interaction entre S4-5L et S6	38
1.4.2. Le découplage en voltage imposé : hypothèse énergétique et cinétique	40
1.4.3. La référence du découplage : Les mutations ILT	42
1.5. Objectifs.....	44
1.5.1. Objectif 1 : Coopérativité et asymétrie du courant de « gating »..	45
1.5.2. Objectif 2: Le « Mode Shift »	46
2. Méthodologie	48
2.1. Avant-propos	48
2.2. Biologie Moléculaire et Expression de Shaker K ⁺	48

2.2.1. Ovocytes.....	50
2.3. Électrophysiologie et Fluorescence.....	51
2.3.1. Fluorescence.....	51
2.3.1.1. Protocole de marquage.....	53
2.3.2. « Cut-Open Voltage Clamp » (COVC)	53
2.3.2.1. Le montage du COVC.....	55
2.3.2.2. Procédure expérimentale.....	56
2.3.2.3. La qualité du clamp en COVC	58
2.4. « Cut-Open Voltage Clamp Fluorescence »	59
2.4.1. Montage expérimentale de l'épifluorescence.....	62
3. Résultats	64
3.1. Article 1	65
3.1.1. Abstract	66
3.1.2. Introduction	67
3.1.3. Experimental procedures.....	69
3.1.3.1. Molecular Biology and Channel Expression.....	69
3.1.3.2. Electrophysiology and Fluorescence Measurements	70
3.1.3.3. Molecular Modeling.....	72
3.1.3.4. Kinetic Modeling	72
3.1.3.5. Steady State of a Sequential Model	73
3.1.4. Results.....	73
3.1.4.1. Mutations in Residues at the S4-S5 Linker/S6 Interface Affect Features of the Gating Current	75
3.1.4.2. Neutralization of E395A Stabilizes the Activated State of the Voltage Sensor	81
3.1.4.3. An Interaction between Arg-394 and Tyr-485 Causes Voltage Sensor Immobilization in the E395A Mutant.....	84
3.1.4.4. Pore Opens in Y485A in the Absence of Slow Component.....	86
3.1.4.5. The RELY Interaction also Develops under Physiological Ion Permeation	88

3.1.4.6. The RELY Interaction Correlates with Channel Opening.....	91
3.1.4.7. Structural Interactions of Tyr-485 Represent Late Closed States in the Activation Pathway; a Five- state Activation Model	93
3.1.5. Discussion	94
3.1.6. Conclusion	99
3.1.7. Acknowledgments	99
3.1.8. Supplementary Data	100
3.1.9. Reference.....	101
3.2. Article 2.....	105
3.2.1. Abstract	106
3.2.2. Introduction.....	107
3.2.3. Materials and Methods.....	110
3.2.4. Results.....	111
3.2.4.1. Shaker mutations I384N and F484G uncouple the voltage sensor movement from pore opening.....	111
3.2.4.2. Uncoupled mutants show a slow off-gating component.....	115
3.2.4.3. Uncoupling removes the shift between on and off- gating	116
3.2.4.4. Shift is mediated during stabilization of the pore in the open state	120
3.2.4.5. Strong coupling increases mode shift	122
3.2.4.6. Weak coupling leads to low open probability	123
3.2.4.7. W434F Mutation but not C-type inactivation influence mode shift mechanism	124
3.2.4.8. Coupling leads to a slow conformational change of the S4	127
3.2.5. Discussion	130
3.2.5.1. Energetic uncoupling of the voltage sensors and pore domain	130

3.2.5.2. The mode shift is caused by a change in the mechanical load on the voltage sensor	133
3.2.5.3. Weak and strong coupling modulate voltage sensor behaviour	136
3.2.5.4. Mode shift is accompanied by movement of the voltage sensors.....	137
3.2.5.5. Relation to other Kv channels	139
3.2.6. Acknowledgements	140
3.2.7. References	140
4. Discussion	147
4.1. Avant-propos	147
4.2. Article 1 : L'asymétrie.....	147
4.2.1. Résumé.....	147
4.2.2. Discussion de l'article 1	148
4.2.2.1. La stabilisation et non l'inactivation lente	148
4.2.2.2. La validation de l'analyse	149
4.2.2.3. Le modèle.....	149
4.2.2.4. Les interprétations du modèle	152
4.2.2.5. Interprétation atomique	154
4.2.2.6. Perspectives.....	155
4.2.2.7. Conclusion	156
4.3. Article 2 : Le « Mode Shift »	156
4.3.1. Résumé.....	156
4.3.2. Discussion de l'article 2	156
4.3.2.1. Perspectives.....	159
4.3.2.2. Conclusion	160
4.4. Hypothèse globale.....	160
5. Conclusion.	164
6. Bibliographie.....	166
7. Annexe	183
7.1. Annexe 1 : Le « Voltage Clamp »	183
7.2. Annexe 2 : « Twin Electrode Voltage Clamp » TEV	184

Liste des Tableaux

- 1. Introduction -

Tableau I.I. Tableau des différentes familles Kv.	13
--	----

- 3. Résultats -

- 3.1. Article 1 -

Table III.I.I. Summary of gating current results in Shaker mutants.	77
--	----

Table III.I.II. Summary of ionic current and fluorescence results in Shaker mutants.	88
---	----

- 3.2. Article 2 -

Table III.II.I. Summary of results of Boltzmann fits to the QVs and GV's of the mutant channels.	115
---	-----

Liste des Figures

- 1. Introduction -

Figure 1.1. Arbre phylogénétique des 143 protéines apparentées structurellement aux canaux ioniques chez l'humain.	3
---	---

Figure 1.2. La fonction des canaux potassiques et la barrière énergétique membranaire.	5
---	---

Figure 1.3. Tétramérisation des sous-unités d'un canal K ⁺	6
--	---

Figure 1.4. Topologie des canaux potassiques.	7
--	---

Figure 1.5. Structure cristalline de KcsA.	8
---	---

Figure 1.6. La structure du filtre de sélectivité.	9
---	---

Figure 1.7. Le mécanisme catalyseur chez les canaux K ⁺	10
---	----

Figure 1.8. Cavité centrale du chemin de conduction et l'ouverture du « helical bundle crossing ».	11
---	----

Figure 1.9. Schéma du senseur de voltage chez les Kv.	12
--	----

Figure 1.10. Illustration des différentes protéines sensibles au voltage détenant un	
--	--

VSD semblable.....	14
Figure 1.11. Illustration des résidus conservés dans le domaine du senseur de voltage.....	15
Figure 1.12. Propriétés de Shaker K+.....	17
Figure 1.13. Structure cristalline Kv1.2.....	18
Figure 1.14. Séquence de Shaker.....	19
Figure 1.15. Illustration du senseur de voltage et de son pore.....	20
Figure 1.16. Illustration de la couche hydrophobique.....	21
Figure 1.17. Les interactions du senseur de voltage.....	22
Figure 1.18. Les interactions lipidiques avec le senseur de voltage.....	23
Figure 1.19. Interactions entre sous-unités.....	24
Figure 1.20. Modèles décrivant le mouvement du segment S4 entre l'état ouvert et fermé.....	26
Figure 1.21. Les courants du senseur de voltage.....	27
Figure 1.22. Le modèle coordonné entre l'état de repos et l'état activé du senseur de voltage.....	28
Figure 1.23. Courant mesuré par voltage imposé.....	29
Figure 1.25. Q-V vs G-V.....	31
Figure 1.26. Un modèle séquentiel.....	34
Figure 1.27. Q-V(ON) : Distribution des charges.....	35
Figure 1.28. Caractéristique du « ON-gating ».....	36
Figure 1.29. Caractéristique du « OFF-gating ».....	37
Figure 1.30. Modèle séquentielle de notre étude.....	37
Figure 1.31. Le lien covalent S4-5L.....	38
Figure 1.32. La chimère Shaker K+/KcsA.....	39
Figure 1.33. Le couplage électromécanique.....	40
Figure 1.34. Représentation en électrophysiologie du découplage.....	41
Figure 1.35. La cinétique du « OFF-gating ».....	41
Figure 1.36. Modèle de découplage pour la mutation ILT.....	42
Figure 1.37. Représentation énergétique du découplage de la mutation ILT.....	43
Figure 1.38. Le modèle à 6 états impliquant la coopérativité du mutant ILT.....	43
Figure 1.39. Les objectifs.....	44

Figure 1.40. Asymétrie entre le « ON- » et « OFF-gating » de Shaker K+.....	45
Figure 1.41. Objectif 1 : Visualisation des acides aminés.....	46
Figure 1.42. Le « Mode Shift ».....	47
Figure 1.43. Objectif 1 : Visualisation des acides aminés.....	48

- 2. Methodologies -

Figure 2.1. Exemple de Shaker K+.....	49
Figure 2.2. Positionnement du fluorophore.....	52
Figure 2.3. Liaison « maleimide » et MTS.	52
Figure 2.4. Injection et marquage d'ovocyte.	53
Figure 2.5. Schéma du Cut-Open Voltage Clamp.....	55
Figure 2.6. Montage du « Cut-Open Voltage Clamp » : Circuit électrique.....	56
Figure 2.7. Protocole de soustraction.....	58
Figure 2.8. Résultats expérimentale du COVGE.	59
Figure 2.9. F-V vs Q-V.....	60
Figure 2.10. Évolution temporelle de Q Vs F (cinétique).....	61
Figure 2.11. Montage du Cut-Open Voltage Clamp Fluorescence COVCF	62

- 3. Résultats -

- Article 1 -

Figure 3.1.1. Candidate interactions among residues on the S4-S5 linker and S6 of adjacent subunits in Shaker K+ channels.....	74
Figure 3.1.2. Gating current profiles in Shaker mutants.	76
Figure 3.1.3. Voltage dependence of gating charge (Q) in Shaker mutants.....	78
Figure 3.1.4. Recovery of off-gating charge by reducing resting potential to -120 mV in E395A and V476A.	80
Figure 3.1.5. Charge immobilization of the voltage sensor in the E395A-W434F Shaker mutant.....	83
Figure 3.1.6. Gating current profiles in Shaker double mutants.	85
Figure 3.1.7. Electromechanical uncoupling of the voltage sensor and pore in Y485A and E395D mutants.....	87

Figure 3.1.8. Voltage sensor movement in the presence of permeating ions.	90
Figure 3.1.9. Slow OFF-gating components during voltage sensor deactivation are partially restored by 4-AP in the E395A mutant.	92
Figure 3.1.10. (Supplementary) Results of the kinetic modeling.	100

- **Article 2** -

Figure 3.2.1. Uncoupling mutants I384N and F484G.	114
Figure 3.2.2. Mode shift is removed in uncoupled mutants I384N and F484G.	118
Figure 3.2.3. Mode shift in Shaker K ⁺ channels.	121
Figure 3.2.4. Open state stabilization, strong and weak coupling.	126
Figure 3.2.5. Fluorescence signal indicating conformational changes of S4.	129

- **4. Discussion** -

Figure 4.1. Le modèle cinétique.	150
Figure 4.2. Le Schéma cinétique qui sous-tend les équations 4.1. et 4.2.	151
Figure 4. 3. I384N-Y485A-W434F, courant de « gating».	161
Figure 4.4. Interaction Baretto et al. En preparation.	163
Figure 4.5. Modèle cinétique	164

- **7. Annexe** -

Figure 7.1. Le voltage imposé (« clamp »).	183
Figure 7.2. Méthode de la double électrode.	184

Liste des abréviations

-A-

A : Acide Aminé Alanine, Ala

A : État *actif* du senseur de voltage

-C-

C : Acide Aminé Cystéine, Cys

Ca²⁺ : Ion de calcium

Ci-VSP : Phosphatase sensible au voltage

COVCF : Cut-Open Voltage Clamp Fluorescence

-D-

D : Acide Aminé Acide Aspartique, Asp

-E-

E : Acide Aminé Glutamate, Glu

-F-

F : Acide Aminé Phénylalanine

F : État *fermé* du pore

F-V : Relation de l'atténuation de Fluorescence en fonction du Voltage

-G-

G : Acide Aminé Glycine, Gly

G-V : Relation de la conductance ionique en fonction du Voltage

-H-

H : Acide Aminé Histidine, His

H⁺ : Proton

HH : Hodgkin Huxley

HP : Potentiel de Maintient

-I-

I : Acide Aminé Isoleucine, Ile

-K-

K : Acide Aminé Lysine, Lys

K^+ : potassium

K_v : Canaux Voltage-Dépendants sélectifs au potassium

-L-

L : Acide Aminé Leucine, Leu

-M-

M : Acide Aminé Méthionine, Met

-N-

N : Acide Aminé asparagine, Asp

Na^+ : Ion de sodium

-O-

O : Élément d'oxygène

O : État *ouvert* du pore

-P-

P_o : Probabilité d'ouverture

PD : Domaine du pore

-Q-

Q-V : Relation de la charge de « gating » en fonction du Voltage

-R-

R : Acide Aminé Arginine, Arg

R : État de *Repos* du senseur de voltage

-S-

S : Segment transmembranaire (S1-S2/TM1)

S4-5L : Lien peptidique qui rejoint le segment S4 à S5

-T-

TEV : Twin Electrode Voltage

TMR : Tetramethylrodhamine

τ : Temps de vie

-V-

V : Acide Aminé Valine, Val

V_o : potentiel à l'équilibre

V_s : intervalle de voltage

VS : Senseur de voltage

-W-

W : Acide Aminé Tryptophane, Trp

-Y-

Y : Acide Aminé Tyrosine, Tyr

Remerciement

En préambule à ce mémoire, je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de ces deux formidables années universitaire.

Je tiens à remercier Dr. Rikard Blunck, qui, en tant que Directeur de recherche, s'est toujours montré à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire. Ce mémoire n'aurait jamais vu le jour sans l'inspiration, l'aide et le temps qu'il a bien voulu me consacrer.

Mes remerciements s'adressent également à Madame Mireille Marsolais, technicienne de laboratoire, pour sa générosité et la grande patience dont elle a su faire preuve malgré ses nombreuses charges professionnelles. Son expertise en biologie moléculaire fut essentielle à toute réussite qui me puisse être associée.

Je tiens aussi à souligner l'accueil bienveillant de mes collègues de travail : Hugo McGuire, Élise Faure et Nicholas Groulx. J'exprime aussi ma gratitude à tous les consultants rencontrés lors des recherches effectuées et qui ont accepté de répondre à mes questions avec courtoisie.

Je remercie également la directrice du département Dr. Lucie Parent, ainsi que les collaborateurs du GEPROM, notamment le Dr. Jeans Yves Lapointe et le Dr. Rémy Sauvé pour leur enseignement, leurs conseils avisés et pour avoir accepté avec gentillesse de lire, de corriger et d'évaluer ce travail.

Je n'oublie pas mes collaborateurs pour leur contribution, leur soutien et leur patience. Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements à tous mes proches et amis, qui m'ont toujours soutenu et encouragé au cours de la réalisation de ce mémoire.

Merci à tous et à toutes.

1. Introduction

L'être vivant est un organisme formé d'un ensemble d'unités fonctionnelles interdépendantes. Son intégrité est maintenue par la régulation des activités cellulaires via différents mécanismes de communication, dont l'intégration de signaux électriques. Une grande partie de la capacité d'adaptation à son environnement est donc commandée par le système nerveux, caractérisé par des cellules hautement spécialisées qui sont reliées pour former un réseau synaptique très complexe. Les propriétés excitables de ces neurones reposent en grande partie sur des protéines membranaires permettant une perméabilité ionique et transitoire, les canaux ioniques. Parmi ceux-ci, on retrouve les canaux voltage-dépendants sélectifs au potassium (Kv). Ils ont été un favori des neurobiologistes et le sont encore, en raison de leur importante contribution à la compréhension de l'excitabilité neuronale et de leurs divers mécanismes d'assemblage.

L'existence et l'implication de structures transmembranaires durant la signalisation électrique a été suggérée il y a 60 ans grâce à l'intuition scientifique de Alan Hodgkin et Andrew Huxley. Récipiendaires du prix Nobel de physiologie et médecine en 1963, ils ont contribué à élucider la nature et le mécanisme de propagation du potentiel d'action (Hodgkin et Huxley, 1952e). Il est clair que les concepts régissant le mécanisme d'activation des canaux voltage-dépendants ainsi que leurs structures étaient inconcevables à cette époque. Il était difficile cependant d'échapper à la conclusion que les modifications de perméabilité ionique devaient directement dépendre d'un changement de conformation localisé dans la membrane. Avec ces hypothèses et le développement technologique, la recherche et le temps ont permis de finalement distinguer les différents domaines qui forment les canaux ioniques dépendants du voltage ; le *senseur de voltage (VS)*, le *pore de conduction* et les « *gates* ».

L'activité des canaux ioniques voltage-dépendants est contrôlée par l'entremise du senseur de voltage. Ce dernier occupe une place centrale dans cette étude, car il régule la distribution des signaux électriques dans les cellules excitables. Son dysfonctionnement mène à une perturbation dans le cycle d'excitabilité membranaire et de là, peut détruire la régulation de plusieurs processus physiologiques. D'ailleurs, on retrouve plus d'une

centaine de pathologies reliées à l'altération génétique des canaux ioniques : le syndrome du long QT relié à des troubles de rythmicité cardiaque, la paralysie périodique hypokaliémique qui empêche les contractions musculaires et l'épilepsie qui cause une hyperactivité cérébrale paroxystique pouvant se manifester par des convulsions qui peuvent mener à la perte de conscience. Plusieurs affections neuronales ont également été identifiées ; la neuromyotonie, un nombre croissant de syndromes épileptiques et les ataxies épisodiques se retrouvent dans ce groupe. L'effet du couplage électromécanique entre le domaine du pore et celui du senseur de voltage est soupçonné d'être fortement impliqué dans ses *canalopathies*. Une compréhension approfondie de ce couplage permettra d'utiliser les senseurs de voltage, dans un futur proche, comme une cible pharmaceutique alternative judicieuse pour restaurer la régulation de l'activité physiologique (Cannon, 2010). Son investigation en termes de relation structure-fonction est donc d'une importance capitale.

Dans cette étude, nous nous concentrerons donc sur l'une des principales questions non résolues dans le domaine de canaux ioniques voltage-dépendants : le mécanisme moléculaire du couplage électromécanique. Les concepts abordés approfondissent la compréhension de l'interaction entre le pore et le senseur de voltage. En premier lieu, nous déterminons les éléments responsables de l'asymétrie cinétique retrouvée lors de la translocation du senseur de voltage entre l'état actif et l'état au repos. En second lieu, nous expliquons le mécanisme moléculaire du couplage électromécanique et déterminons comment l'énergie se transfère entre le senseur de voltage et le pore.

Une revue de littérature sur les canaux potassiques dépendants du voltage débute l'introduction. Par la suite, le lecteur sera familiarisé aux méthodes d'électrophysiologie en voltage imposé à haute résolution et de spectroscopie de fluorescence. Finalement, le couplage électromécanique sera abordé avec les objectifs détaillés de cette recherche.

1.1. Les canaux potassiques

Parmi tous les canaux ioniques, ceux sélectifs au potassium sont les plus diversifiés (Mazzuca et Lesage, 2007) (Figure 1.1). L'ubiquité de cette famille suggère leur ancienneté dans le processus évolutif et leur importance dans le fonctionnement des organismes. Le génome humain contient 77 gènes codant pour des canaux K⁺, dont une grande majorité s'expriment dans le système nerveux (HUGO : human genome project). Le ver *C. elegans*, un organisme très simple qui n'utilise que 302 neurones, en détient autant. (Salkoff, Wei *et al.*, 2005). La figure 1.1 montre que les canaux K⁺ sont plus importants en nombre et en diversité que les autres canaux ioniques retrouvés chez l'humain.

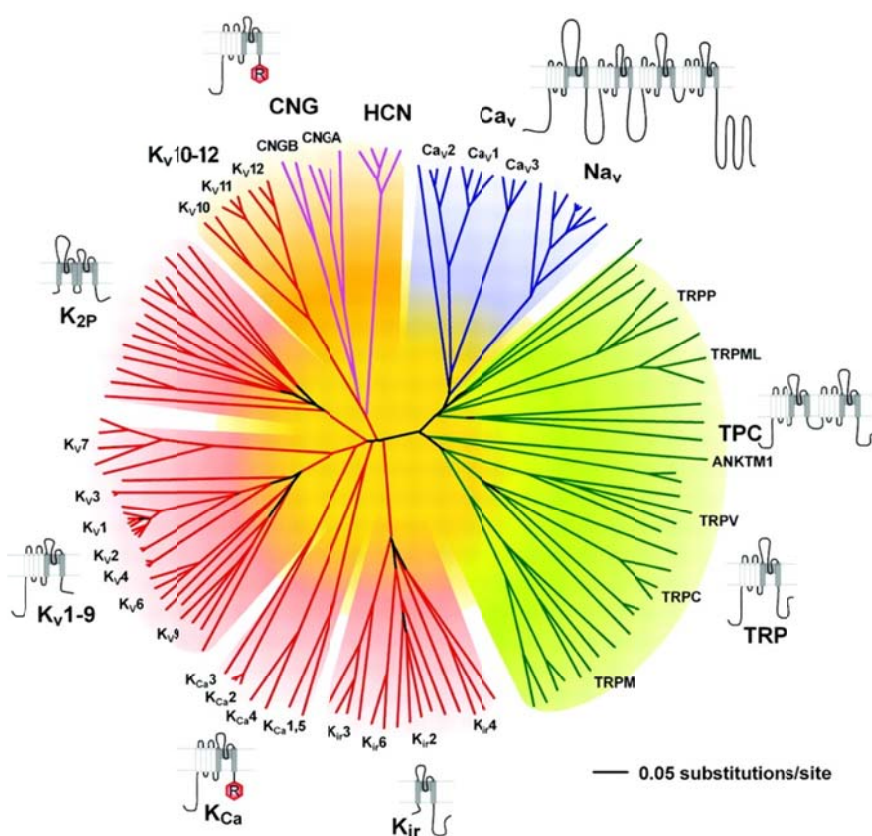


Figure 1.1. Arbre phylogénétique des 143 protéines apparentées structurellement aux canaux ioniques chez l'humain.

Ce schéma met en évidence les différents groupes de canaux ioniques et leur topologie respective. Les canaux Na_v et Ca_v sont en bleu, les canaux potassiques sont en rouge, les canaux HCN et CNG en magenta et les canaux mécano-sensitifs (TRP) et leurs cousins en vert. Adapté de (Yu, 2005).

1.1.1. La fonction des canaux potassiques

En général, la fonction de toute protéine est fermement reliée à sa configuration tridimensionnelle. Dans le cas d'un canal, lorsque sa structure ressent une variation locale dans l'environnement, il répond « instantanément » par un changement de conformation favorable à la formation d'un pore qui permettra la conduction ionique. Concrètement, les canaux ioniques subissent un mouvement d'*ouverture* ou de *fermeture* leur permettant de contrôler l'accès des ions à l'intérieur de leur pore central pour ensuite les acheminer à travers la bicouche lipidique (Figure 1.2a). Le rôle des canaux est donc de transporter, plus ou moins sélectivement, des ions à travers une membrane de phospholipides extrêmement hydrophobe, qui seraient incapables sinon de franchir une telle barrière énergétique. (Figure 1.2b).

Les canaux potassiques conduisent les ions potassium (K^+) à une vitesse de l'ordre de 10^7 ions par seconde, tout en conservant une très grande sélectivité. Il est pertinent de comprendre comment un simple pore peut avoir une fonction aussi spécialisée, sachant que par exemple, les ions sodiques sont de plus petite taille et représentent une variation dimensionnelle aussi petite que 0.8 Å de diamètre (2.7 Å (K^+) contre 1.9 Å (Na^+)). Pour accomplir une telle fonction, le pore des canaux K^+ doit être doté d'une structure complexe et ne peut être défini comme un simple orifice qui s'ouvre et se ferme, puisqu'il doit non seulement distinguer un type d'ion spécifique, mais aussi minimiser les dépenses énergétiques pour avoir un transport de grande efficacité.

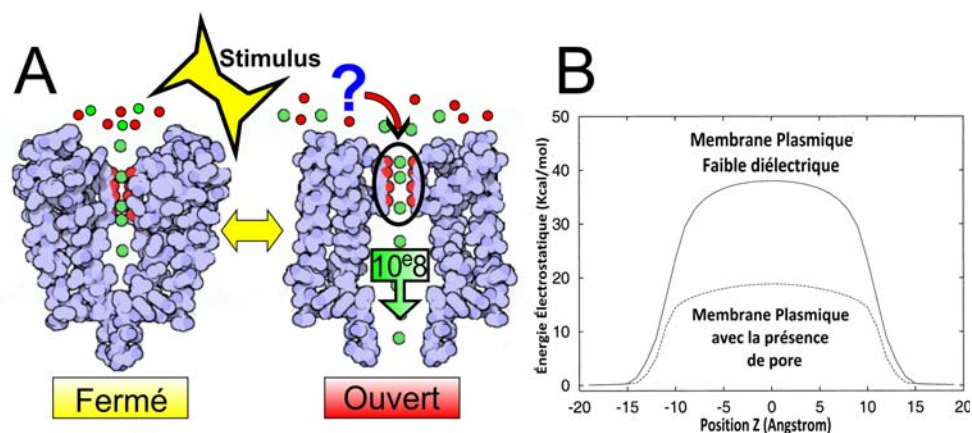


Figure 1.2. La fonction des canaux potassiques et la barrière énergétique membranaire.

(A) En réponse à un stimulus, les canaux changent de conformation pour laisser passer les ions K^+ (Vert) et non les ions Na^+ (Rouge). (B) La présence de canaux (ligne hachurée du bas) dans la membrane diminue l'énergie électrostatique ressentie par les ions lors du passage membranaire (ligne continue du haut). Adapter de (Roux, Berneche *et al.*, 2000).

La structure des canaux K^+ possède donc plusieurs caractéristiques saillantes, mais avant de les introduire, le lecteur sera éclairé sur leur classification ainsi que sur leurs mécanismes de base tels que le principe de sélectivité et de conduction.

1.1.2. Classification topologique et homologie structurale

Les canaux K^+ sont des complexes protéiques polymériques composés de sous-unités membranaires. Leur architecture typique est tétramérique : les monomères sont regroupés et distribués autour d'un axe de rotation défini par le chemin de conduction. Chacune de ces sous-unités est déplacée de 90° dans le plan de la membrane par rapport à selon la sous-unité adjacente pour former une structure de symétrie quaternaire (Figure 1.3).

Excluant le domaine membranaire, les canaux potassiques sont dotés de plusieurs structures intracellulaires qui leur permettent d'interagir avec le milieu cytoplasmique. Certaines ont la responsabilité de réguler leur activité, comme le peptide NH_2 (Terminus-N). D'autres ont le rôle de stabiliser l'ensemble du canal, notamment le domaine de tétramérisation des Kv , qui permet au canal de s'assembler lors de la genèse

des sous-unités (Choe, 2002). De plus, cet ensemble fonctionnel peut interagir avec plusieurs sous-unités auxiliaires telles que des protéines de régulation et de signalisation (kinases, phosphatases, protéines G) ou avec le cytosquelette.

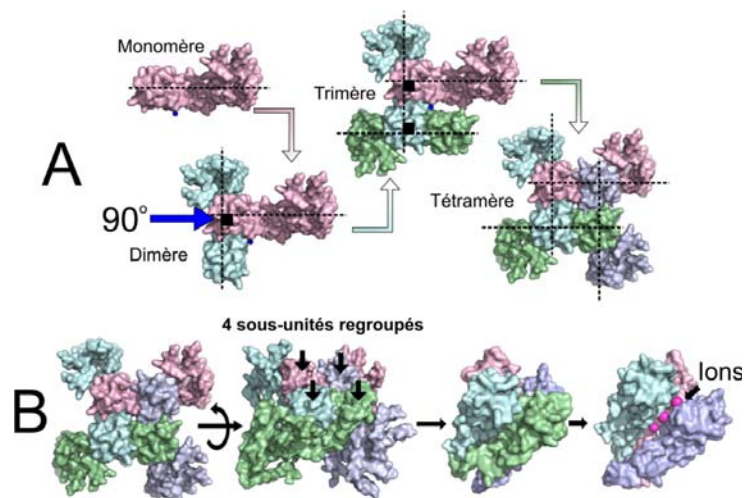


Figure 1.3. Tétramérisation des sous-unités d'un canal K⁺.

(A) Illustration de l'assemblage des sous-unités d'un canal potassique vu du dessus. La structure est orientée de 90° par rapport à la sous-unité adjacente. (B) Vue 3D de l'agencement tétramérique de Kv1.2 et de la présence des ions dans le pore centrale. Construit à partir de la structure 3LUT.pdb

Les canaux K⁺ sont classés selon le processus de signalisation auquel leur structure répond. Certains ressentent le changement du potentiel membranaire, les canaux potassiques voltage-dépendants (Kv), tandis que d'autres s'activent par la présence de calcium intracellulaire (Kca), certains nécessitent les deux (BKca). Les canaux potassiques à rectification entrante (Kir) sont sensibles à la présence de polyamines et les canaux à double pore (K2p), réagissent aux protéines G (SUMO, Vpu1) (Plant, Rajan *et al.*, 2005).

Un trait distinctif entre les canaux potassiques se retrouve dans la séquence primaire de leur gène. Chaque sous-unité transcrite possède une nomenclature spécifique à sa famille. Par exemple, la famille des Kir est composée de deux segments transmembranaires reliés par un segment peptidique extracellulaire (Figure 1.4a). Cet ensemble définit ce qu'on surnomme le domaine du pore (PD), tandis que les canaux Kv sont composés de ce dernier plus quatre autres segments transmembranaires (S1-S4) identifiés comme le senseur de voltage (VSD) (Figure 1.4a centre).

Parmi toutes ces familles, il existe une grande similitude dans la topologie du domaine du pore (2TM|P). Cette ressemblance suggère que le mécanisme de conduction d'ions chez les différentes familles K^+ est conservé. Ce domaine a une structure particulière qui est universelle aux canaux potassiques : le P-loop (Heginbotham, Abramson *et al.*, 1992; Heginbotham, Lu *et al.*, 1994). Ce dernier est constitué de trois sections : une structure de répulsion (tourelle), une petite hélice- α et une signature séquentielle TMxTVGYG (Doyle, 1998) nommée le filtre de sélectivité.

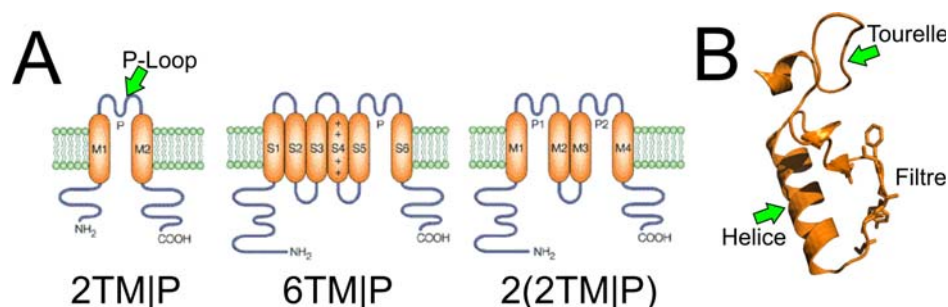


Figure 1.4. Topologie des canaux potassiques.

(A) Représentation topologique des différentes familles K^+ : Kir (gauche), Kv et Kca (centre) et K2p (droite). Adapté de (Choe, 2002). (B) Structure cristallographique illustrant le P-Loop de KcsA : La tourelle, l'hélice- α et le filtre de sélectivité (TMxTVGYG). Construit à partir de la structure 1K4C.pdb.

1.1.3. La structure du pore et ses propriétés

Les études approfondies en électrophysiologie jumelées à la mutagenèse dirigées, depuis l'ère de Hodgkin et Huxley, ont abouti à des modèles qui décrivent assez bien le comportement cinétique des canaux K^+ (Bezanilla, Perozo *et al.*, 1994; Sigworth, 1994; Zagotta, Hoshi *et al.*, 1994; Schoppa et Sigworth, 1998a; Armstrong, 2003; Bezanilla, 2005). Cependant, ce n'est qu'en 1998 qu'une première structure cristalline fut établie, celle du canal potassique KcsA, à une résolution de 3.2 Å (Figure 1.5a) (Doyle, 1998). À partir de cette structure, plusieurs propriétés biophysiques ont pu être vérifiées.

KcsA est un canal potassique d'origine procaryote qu'on retrouve chez la *Streptomyces lividans* (Schrempf, Schmidt *et al.*, 1995). Il est activé par la variation du pH intracellulaire (Cuello, Romero *et al.*, 1998 ; Heginbotham, LeMasurier *et al.*, 1999). De plus, il possède une topologie similaire à celle de la famille Kir avec seulement deux

segments transmembranaires (TM1 et TM2), mais sa séquence d'acides aminés présente plus d'homologie avec les canaux voltage-dépendants (Kv). En fait, ce canal a une certaine sensibilité au voltage. Une partie chargée de sa structure, E71, le rend légèrement plus actif durant une dépolarisation (Heginbotham, LeMasurier *et al.*, 1999; Meuser, Splitt *et al.*, 1999; Cordero-Morales, Cuello *et al.*, 2006a), cependant il n'est pas activé par le voltage en raison de l'absence de senseur de voltage (S1-S4).

Selon la Figure 1.5b, la distribution transmembranaire du pore est largement asymétrique : elle est constituée d'un filtre très étroit situé du côté extracellulaire qui s'ouvre sur une grosse cavité hydrophobique établie au centre de la membrane suivie d'un vestibule interne délimité par les segments TM2. Le pore a une longueur de 45 Å (Shieh, Coghlan *et al.*, 2000) qui varie en diamètre entre le vestibule interne, la cavité centrale et le filtre de sélectivité. L'agencement de sa structure tétramérique dans l'état fermé ressemble à un cône inversé (« teepee »), une architecture typique retrouvée partout chez les canaux ioniques.

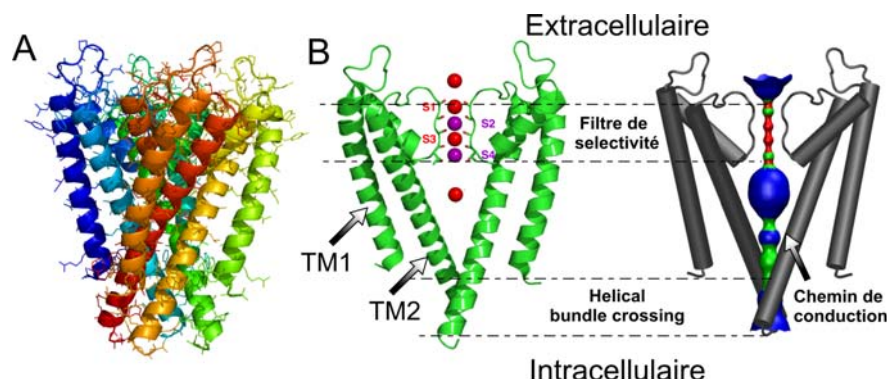


Figure 1.5. Structure cristalline de KcsA.

En (A) on retrouve la structure complète de KcsA cristallisé dans l'état fermé (1BL8.pdb). (B) On représente deux des quatre sous-unités de KcsA et la distribution des ions K⁺ le long du pore. À droite, on illustre le pore de conduction et ses variations en diamètre (SBCB, Université of Oxford).

La structure cristalline de KcsA a permis d'élucider le mécanisme de sélectivité du pore pour tous les canaux K⁺, procaryotes et eucaryotes. Il a été démontré que le filtre de sélectivité contrôle la sélectivité au K⁺ car la mutation d'un résidu de cette séquence peut perturber voire empêcher la distinction entre les différents cations (Heginbotham, Lu *et al.*, 1994). Mais comment fait-il pour favoriser le passage des ions K⁺ au détriment des autres ions? D'abord, on remarque que chaque entrée, intracellulaire et

extracellulaire, est composée d'acides aminés chargés négativement (Figure 1.6a). Ces tourelles causent une répulsion des anions et favorisent une population d'ions positifs proche des entrées. Ensuite, le filtre de sélectivité, logé dans la partie la plus étroite du pore, est composé de résidus dont les groupements carbonyles sont tous orientés vers l'intérieur du pore. Ces groupes C=O forment quatre anneaux successifs d'un diamètre de 3 Å entre chaque paire d'atomes d'oxygène. (Figure 1.6b). Un diamètre juste suffisant pour envelopper un ion K⁺ (2.7 Å) non hydraté. Comment la structure compense-t-elle le coût énergétique de cette déshydratation obligatoire? Les quatre atomes d'oxygène de chaque anneau formé par les groupes carbonyles agissent comme substitués des atomes d'oxygène des molécules d'eau (Figure 1.6b). Cet échange stabilise l'ion lors de son passage, abaissant ainsi la barrière d'énergie. L'ion Na⁺, principal compétiteur, a un diamètre déshydraté de 1.9 Å, et est donc trop petit pour être stabilisé efficacement par le squelette du filtre de sélectivité. De plus, les acides aminés entourant le filtre forment des interactions très fortes et donnent une grande rigidité à la structure, empêchant ainsi le filtre de s'adapter au diamètre d'autres ions (Figure 1.6e) (Roux, Berneche *et al.*, 2000; Berneche et Roux, 2001). Cependant, il ne faut pas croire que la conformation du filtre de sélectivité est unique, elle est très dynamique. Des mesures de fluorescence ont réussi à démontrer que son orientation peut varier et imposer une barrière à la circulation ionique (Blunck, Cordero-Morales *et al.*, 2006; Cordero-Morales, Cuello *et al.*, 2006b; Chakrapani, Cordero-Morales *et al.*, 2007a;b).

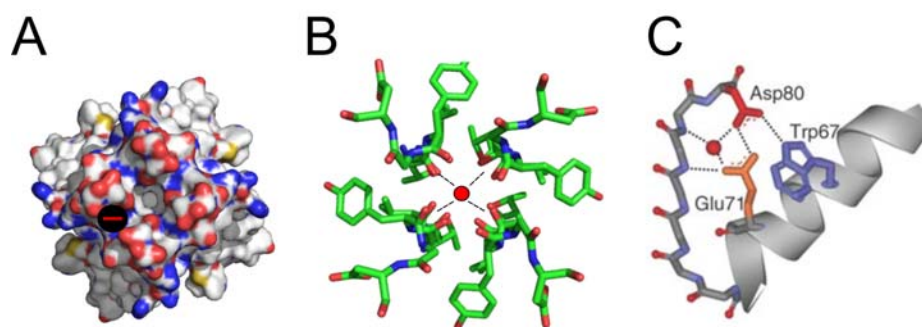


Figure 1.6. La structure du filtre de sélectivité.

(A) Illustration démontrant la surface électrostatique du canal KcsA (Vue d'en bas). Les surfaces en rouge représentent des charges négatives, et les surfaces bleues, positives. (B) Une illustration des interactions du squelette stabilisant les ions K⁺ dans le filtre (4/8 des interactions) (1BL8.pdb). (C) Illustration des résidus responsables de la rigidité du filtre de sélectivité et de la stabilisation de l'état ouvert. La stabilité du filtre est gouvernée par les interactions Glu71, Asp80 et Trp67. Adapté de (Cordero-Morales, Cuello *et al.*, 2006b).

Les interactions moléculaires permettent à l'ion de circuler dans le pore à une vitesse proche de la limite de diffusion. Les simulations de dynamique moléculaire ont permis d'estimer que deux ions K^+ pouvaient se retrouver en même temps dans le filtre de sélectivité (Berneche et Roux, 2001; Morais-Cabral, Zhou *et al.*, 2001). L'obtention d'une structure de KcsA résolue à 2.0 Å dans différentes conditions ioniques (Zhou, Morais-Cabral *et al.*, 2001), a ensuite permis l'observation de six sites de liaison dans la région du filtre de sélectivité : quatre internes (S1, S2, S3, S4) et deux externe (S0, S5) (Figure 1.7a). Ces sites de liaison sont situés entre les anneaux du squelette de manière à fournir huit atomes d'oxygène pour coordonner le mouvement de chaque ion (Figure 1.7b). Cette coordination géométrique est conservée même dans la partie externe du filtre, où quatre molécules d'eau contribuent à stabiliser l'ion situé du côté extracellulaire avec quatre atomes d'oxygène du squelette.

La circulation ionique est régie par l'arrivée d'un ion K^+ externe (S0) ou intracellulaire qui crée une répulsion entre les ions déjà présents (S1-S3) et les obligent à se déplacer aux sites de liaison interne; S2-S4 (Figure 1.7b-c). Il a été suggéré que ce déplacement est permis grâce à une barrière d'énergie très petite, même inexistante, créant un déplacement sans résistance. Alors, une explication partielle de l'origine du mécanisme catalyseur est fournie par la répulsion électrostatique entre les ions déshydratés, étroitement liés le long du filtre de sélectivité.

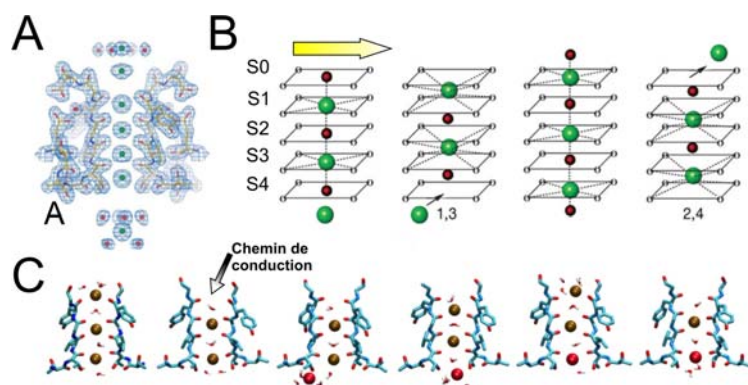


Figure 1.7. Le mécanisme catalyseur chez les canaux K^+ .

L'illustration en (A) montre une carte de la densité électronique ($2F_o-F_c$) dans la région du filtre de sélectivité. Elle couvre les résidus (jaune) les ions K^+ (Vert) et les molécules d'eau les entourant (Rouge). (B & C) Illustration montrant les étapes de déplacement des ions K^+ dans le filtre de sélectivité. Adapté de (Zhou, Morais-Cabral *et al.*, 2001).

Le centre d'une membrane lipidique est un milieu peu polarisable. Par conséquent, un ion, qui a tendance à polariser son environnement pour se stabiliser, fera face à une barrière énergétique incroyablement élevée à cet endroit. La cavité centrale et le vestibule intracellulaire possèdent de nombreux groupements hydrophobes afin de minimiser les interactions avec l'ion. Sa localisation (au milieu de la membrane) ainsi que sa taille permettent à l'ion de s'hydrater et ainsi de franchir cette barrière électrostatique (Figure 1.8a). Enfin, l'élimination de la barrière énergétique le long du pore est assurée par la conception structurale et chimique des canaux potassiques. Ceci permet de minimiser la résistance au transfert et facilite l'existence d'un haut débit ionique qui peut atteindre la limite de diffusion libre.

1.1.3.1. L'ouverture du pore

Chez la plupart des canaux K⁺, on retrouve une agglomération de segments hélicaux du côté intracellulaire, le « helical bundle crossing » (Figure 1.8b). Dans l'état fermé, les extrémités C-terminal des segments TM2 ou S6 de chaque sous-unité se regroupent pour former une barrière d'un diamètre < 4 Å. Le « *bundle crossing* » agit comme porte principale chez les canaux K⁺. L'ouverture de cette région d'occlusion permet la conduction des ions K⁺. Même si cette structure est universelle, le mécanisme contrôlant son ouverture n'est pas identique pour chaque famille topologique. À vrai dire, c'est à cause de leur distinction topologique que le processus d'activation est différent.

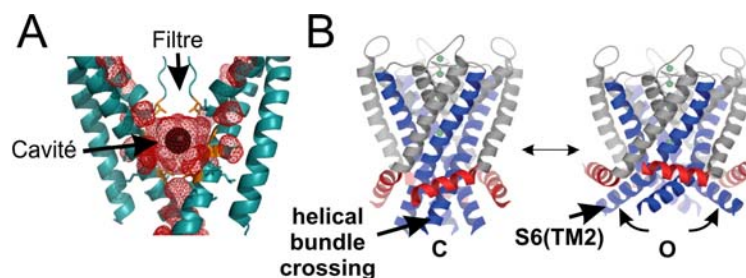


Figure 1.8. Cavité centrale du chemin de conduction et l'ouverture du « helical bundle crossing ».

(A) Illustration de la cavité centrale (surface en rouge) où l'ion (noir) est stabilisé. Construit à partir de H006.pdb. (B) Modèle à partir de Kv1.2 de l'ouverture et la fermeture du « helical bundle crossing » chez les canaux K⁺. Adapté de (Long, 2005b)

Maintenant que les propriétés de conduction fondamentale sont introduites, le senseur de voltage sera décrit pour ensuite expliquer le mécanisme d'activation chez les canaux Kv.

1.1.4. Le senseur de voltage

Il existe une grande diversité de protéines membranaires qui exploitent les variations du champ électrique pour réguler leur activité. Comment une protéine peut-elle détecter un changement de voltage et subir une réorientation structurale suite à ce changement? Pour qu'un objet interagisse fortement avec un champ électrique, l'objet en question doit être chargé (ou polaire). Le domaine du senseur de voltage n'échappe pas à la règle.

Les canaux ioniques dépendants du voltage, composés de six segments transmembranaires (S1-S6), sont chargés sur leurs segments S4, S3 et S2 (Figure 1.9). Ces segments sont assez conservés à travers la famille des canaux ioniques dépendants du voltage : K⁺, Na⁺, Ca⁺⁺ et même les transporteurs de protons (H⁺). Cette étude se concentre sur le senseur de voltage (S1-S4) des canaux potassiques, mais la majorité des caractéristiques présentées peuvent s'appliquer à ces grandes familles.

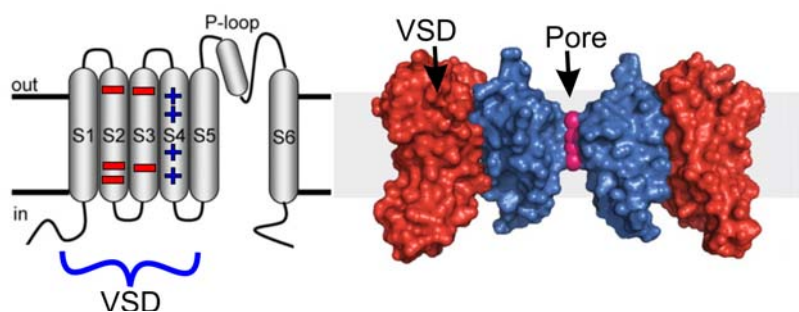


Figure 1.9. Schéma du senseur de voltage chez les Kv.

À gauche, on illustre la topologie des segments membranaires où les segments S1-S4 représentent le senseur de voltage. S4 est chargé positivement (Arginines), S2 & S3 sont chargés négativement. Adapté de (Wynia-Smith, Gillian-Daniel *et al.*). À droite, on montre la séparation entre les domaines du senseur de voltage (VSD) et celui du pore. Adapté de (Morin et Kobertz, 2008).

1.1.4.1. La famille des Kv et leur homologie

Parmi tous les canaux K⁺ retrouvés dans le génome humain, la famille des Kv est prépondérante, avec plus de 40 gènes. En fonction de l'homologie de séquence des

segments transmembranaires, ces canaux ont été regroupés en 12 classes (Kv1-12) (Tableau I.I) (Gutman, 2005). Les propriétés suivantes sont également prises en compte dans la classification : rectification entrante ou sortante, inactivation rapide ou lente, activation rapide ou lente, etc. Les canaux Kv peuvent former des structures homotétramériques ou hétérotétramériques (Norton, Pennington *et al.*; Wua et Dworetzky, 2005). Les hétérotétramères sont formés de différentes sous-unité au sein d'une même famille et manifestent des propriétés électriques considérablement différentes de leur homologue homotétramérique (Gutman 2005; Misonou and Trimmer, 2004).

IUPHAR	HGNC	Other
<i>K_v1.1</i>	<i>KCNA1</i>	<i>Shaker</i> -related family
<i>K_v1.2</i>	<i>KCNA2</i>	
<i>K_v1.3</i>	<i>KCNA3</i>	
<i>K_v1.4</i>	<i>KCNA4</i>	
<i>K_v1.5</i>	<i>KCNA5</i>	
<i>K_v1.6</i>	<i>KCNA6</i>	
<i>K_v1.7</i>	<i>KCNA7</i>	
<i>K_v1.8</i>	<i>KCNA10</i>	
<i>K_v2.1</i>	<i>KCNB1</i>	<i>Shab</i> -related family
<i>K_v2.2</i>	<i>KCNB2</i>	
<i>K_v3.1</i>	<i>KCNC1</i>	<i>Shaw</i> -related family
<i>K_v3.2</i>	<i>KCNC2</i>	
<i>K_v3.3</i>	<i>KCNC3</i>	
<i>K_v3.4</i>	<i>KCNC4</i>	
<i>K_v4.1</i>	<i>KCND1</i>	<i>Shal</i> -related family
<i>K_v4.2</i>	<i>KCND2</i>	
<i>K_v4.3</i>	<i>KCND3</i>	
<i>K_v5.1</i>	<i>KCNF1</i>	Modifier
<i>K_v6.1</i>	<i>KCNG1</i>	Modifiers
<i>K_v6.2</i>	<i>KCNG2</i>	
<i>K_v6.3</i>	<i>KCNG3</i>	
<i>K_v6.4</i>	<i>KCNG4</i>	
<i>K_v7.1</i>	<i>KCNQ1</i>	<i>KVLQT</i>
<i>K_v7.2</i>	<i>KCNQ2</i>	<i>KQT2</i>
<i>K_v7.3</i>	<i>KCNQ3</i>	
<i>K_v7.4</i>	<i>KCNQ4</i>	
<i>K_v7.5</i>	<i>KCNQ5</i>	
<i>K_v8.1</i>	<i>KCNV1</i>	Modifiers
<i>K_v8.2</i>	<i>KCNV2</i>	
<i>K_v9.1</i>	<i>KCNS1</i>	Modifiers
<i>K_v9.2</i>	<i>KCNS2</i>	
<i>K_v9.3</i>	<i>KCNS3</i>	
<i>K_v10.1</i>	<i>KCNH1</i>	<i>eag1</i>
<i>K_v10.2</i>	<i>KCNH5</i>	<i>eag2</i>
<i>K_v11.1</i>	<i>KCNH2</i>	<i>erg1</i>
<i>K_v11.2</i>	<i>KCNH6</i>	<i>erg2</i>
<i>K_v11.3</i>	<i>KCNH7</i>	<i>erg3</i>
<i>K_v12.1</i>	<i>KCNH8</i>	<i>elk1, elk3</i>
<i>K_v12.2</i>	<i>KCNH3</i>	<i>elk2</i>
<i>K_v12.3</i>	<i>KCNH4</i>	<i>elk1</i>

Tableau I.I. Tableau des différentes familles Kv.

Classement des Kv selon leur nom attribué par l'Union internationale de pharmacologie (IUPHAR) et par le Comité de la nomenclature Gene (HGNC) (<http://www.gene.ucl.ac.uk>). Adapté de (Gutman, 2005).

1.1.4.2. La diversité des senseurs de voltage et leur motif conservé

En 1993, il a été démontré que le senseur de voltage des canaux Kv est un domaine actif séparé du pore de conduction (Kubo, Reuveny *et al.*, 1993). Sachant que le pore K^+ peut exister séparément, il a été suggéré que le VSD aurait évolué séparément comme une protéine autonome et qu'il aurait été relié seulement plus tard dans l'évolution à un domaine conducteur (Kumanovics, Levin *et al.*, 2002). La découverte de l'enzyme Ci-VSP (de l'ascidie), une phosphatase comportant un domaine sensible au voltage homologue à celui des canaux Kv, (Murata, Iwasaki *et al.*, 2005) (Figure 1.10 et 1.11) renforce cette idée. Il s'agit du premier senseur de voltage isolé qui répond au potentiel membranaire pour activer autre chose qu'un pore de conduction (Murata et Okamura, 2007; Kohout, Bell *et al.*, 2010).

Le même groupe de recherche (Okamura, Japanese National Institute for Physiological Sciences) a isolé un autre senseur de voltage (mVSOP), qui lui ne possède aucune autre structure centrale telle qu'une enzyme ou un pore (Sasaki, 2006). Son isoforme humaine fut identifiée et appelé Hv1 (Ramsey et Hagopian, 2006). Ces découvertes supportent l'idée que le senseur de voltage peut fonctionner comme une structure autonome et indépendante.

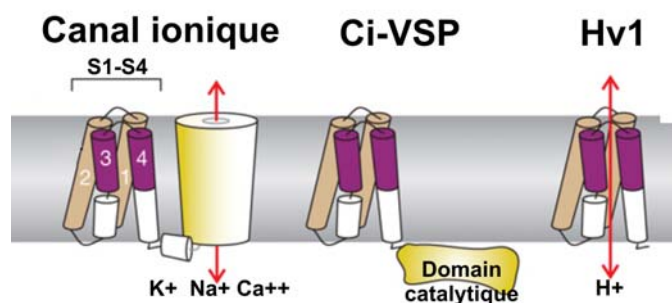


Figure 1.10. Illustration des différentes protéines sensibles au voltage détenant un VSD semblable.

Comparaison du domaine actif chez les différentes protéines sensibles au voltage (S1-S4). Le VSD des canaux dépendants du voltage est relié à un pore, le VSD de la phosphatase Ci-VSP est lié à un domaine catalytique soluble. Chez les canaux conduisant les protons, le VSD perméabilise les H^+ à travers le domaine S1-S4. Adapté de (Swartz, 2008).

Le mécanisme de dépendance au voltage chez les canaux Kv provient donc principalement des segments S1-S4 (Aggarwal et MacKinnon, 1996; Seoh, Sigg *et al.*, 1996; Jiang, Lee *et al.*, 2003; Chanda, Asamoah *et al.*, 2005). L'alignement de séquences montré à la figure 1.11 illustre un motif périodique d'acides aminés chargés positivement hautement conservé dans tous les segments S4. Ces cinq résidus, R1, R2, R3, R4 et K5 (Figure 1.11, en rouge), sont considérés comme la source principale de la sensibilité au voltage (Sigworth, 1994; Aggarwal et MacKinnon, 1996). Leur neutralisation diminue le nombre de charges totales transportées durant l'activation et réduit la dépendance au voltage (Papazian, Timpe *et al.*, 1991). Cette périodicité a un effet important sur l'orientation des charges au sein de l'hélice S4.

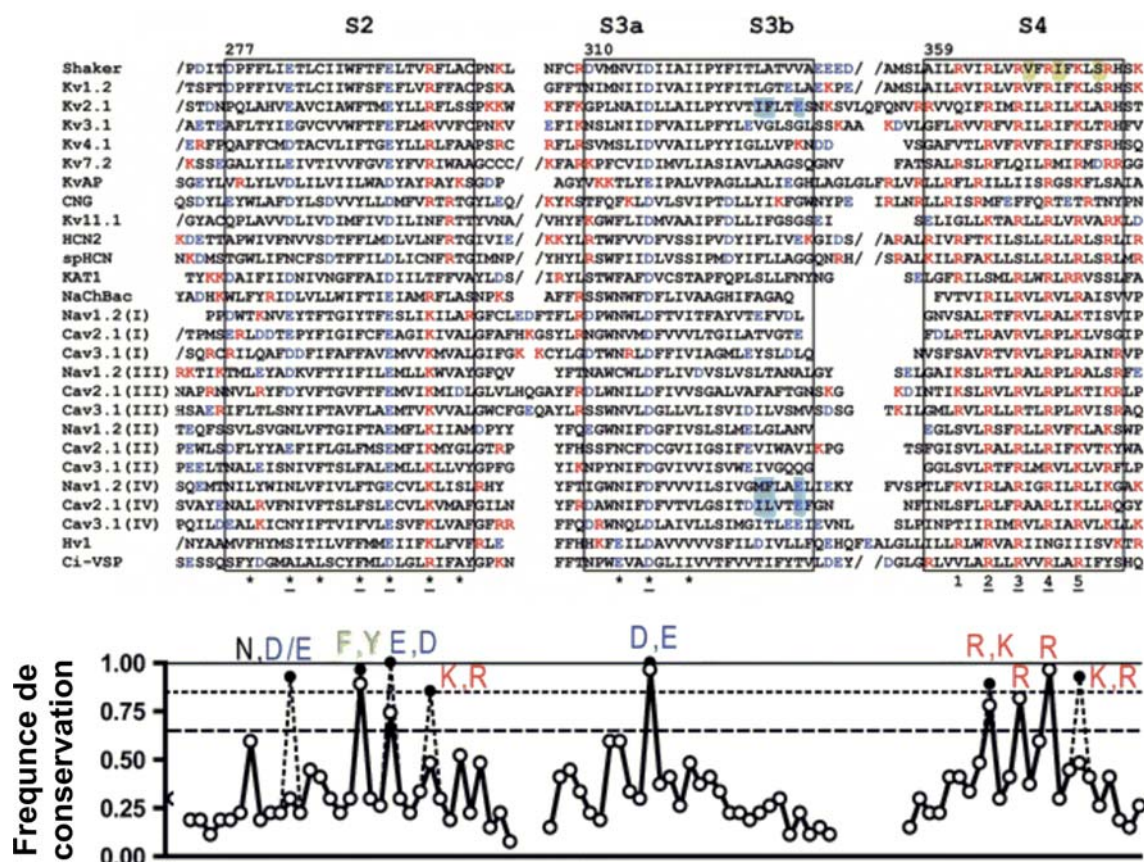


Figure 1.11. Illustration des résidus conservés dans le domaine du senseur de voltage.

Alignement de 27 domaines sensibles au voltage. En rouge les charges positives, en bleu les charges négatives et en vert les acides aminés non chargés les plus conservés. Adapté de (Börjesson et Elinder, 2008).

Le mécanisme de détection du voltage se décrit comme suit : lors de la dépolarisation membranaire, les charges R1 à K5 (ainsi que les dipôles) se réorientent dans la

membrane selon l'intensité du nouveau champ électrique (direction constante) et ce faisant, modifient la conformation du VSD. Ce mouvement est ensuite communiqué au pore.

1.1.5. La structure et les propriétés fonctionnelles des canaux Kv

Avant d'aborder l'aspect principal de cette étude, quelques modèles conceptuels de canaux Kv incluant diverses études fonctionnelles et leurs structures cristallines seront présentés. On débutera avec une présentation du modèle utilisé pour notre étude : le canal *Shaker* K⁺ de la *Drosophila melanogaster*.

1.1.5.1. Shaker K⁺ de la drosophile melanogaster

Chez le génome de la mouche drosophile (Adams, 2000) on retrouve le gène de *Shaker* K⁺, le premier canal K⁺ à avoir été cloné (Tempel, Papazian *et al.*, 1987). Son clonage a ouvert la voie à l'identification de la famille des canaux homologues chez les vertébrés, la superfamille des Kv. Leur implication dans le contrôle de la direction de propagation et de la repolarisation du potentiel d'action a pu être démontrée (Hoffman, Magee *et al.*, 1997). Ils ont aussi pour rôle de filtrer les signaux excitateurs en retardant l'apparition du potentiel d'action (Debanne, Guerineau *et al.*, 1997).

Shaker K⁺ est distingué par son courant potassique de type A (I_a) (Figure 1.12a). Il s'active lors d'une dépolarisation où le potentiel membranaire est supérieur à -50 mV (Figure 1.12b) (Gola et Romey, 1971). Les courants I_a se différencient des autres types de courant (les courants à rectification retardée (I_d) par exemple) (Hodgkin et Huxley, 1952b) par la rapidité de leur cinétique d'activation (ouverture) et d'inactivation. Cette inactivation comporte deux mécanismes moléculaires distincts. L'inhibition *rapide* de la conduction malgré la constance d'un stimulus est due à l'insertion mécanique d'un des quatre extrémités amino-terminales (N-terminal) du canal dans un creux relié au pore de conduction (Figure 1.12c), (Hoshi, Zagotta *et al.*, 1990; Demo et Yellen, 1991; Ruppertsberg, Frank *et al.*, 1991). Dans cet état, le canal inactivé ne répond plus au stimulus activateur. Pour terminer cette inactivation, une repolarisation du potentiel à

une valeur inférieure que -60 mV est nécessaire. Le second type d'inactivation implique le l'extrémité carboxy-terminal (C-terminal), qui cause un changement de conformation au niveau du filtre de sélectivité (Figure 1.12c) et empêche graduellement le courant ionique de traverser le chemin de conduction (Cuello, Jogini *et al.*, 2010). Sa constante de temps d'atténuation tourne autour des minutes (Figure 1.12a). L'inactivation de Type-C sera grandement discutée dans la section finale de la thèse.

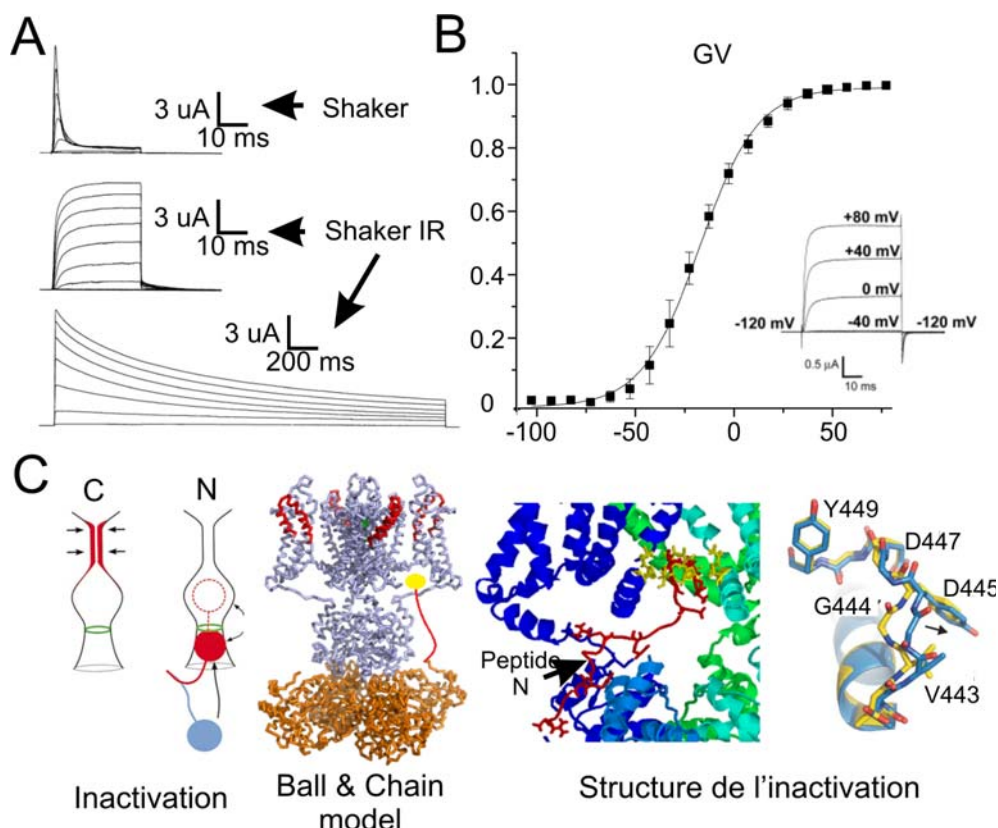


Figure 1.12. Propriétés de Shaker K^+ .

L'illustration en (A) montre l'implication de l'extrémité amino-terminal (N-terminal) dans l'inactivation. Le courant ionique de Shaker K^+ avec son N-terminal (haut), sans le N-terminal (IR) (Centre) et sans le N-terminal à de longues dépolarisations (3 secondes). Adapté de (Olcese, Latorre *et al.*, 1997). (B) La conductance en fonction du voltage, V_{50} : -22.4 mV. Adapté de (Gagnon et Bezanilla, 2009). (C) À gauche, une schématisation des types d'inactivation retrouvés chez les canaux Kv. À droite les processus moléculaires décrivant le type d'inactivation (à gauche, l'inactivation rapide, le peptide du terminal N s'incorpore dans un creux situé entre le domaine de tétramérisation et le domaine membranaire; à droite, l'inactivation lente, le filtre de sélectivité s'écrase et empêche la circulation ionique. Les résidus responsables sont V443, G444 et D445.) Adapté de (Kurata, Soon *et al.*, 2002; Cuello, Jogini *et al.*, 2010) et (Comacho, 2008).

La plupart des connaissances fonctionnelles dans le domaine des Kv proviennent d'études effectuées sur le canal Shaker K⁺ de la *Drosophila melanogaster* et ses homologues eucaryotes car ils peuvent facilement être surexprimés dans un système cellulaire (Bezanilla, 2000). Puisque ce canal est un homotétramère, l'introduction d'une mutation dans la séquence formera un canal totalisant 4 mutations identiques. Le remplacement de 4 résidus crée une amplification du comportement fonctionnel, ce qui permet de bien voir les variations énergétiques. L'importance de ce canal est soulignée par l'existence d'une structure cristalline eucaryote de la même famille. Ceci simplifie énormément l'analogie structure-fonction entre les résultats d'électrophysiologie et la modélisation structurale. Cette structure fut résolue en 2005 par l'équipe de Roderick MacKinnon (Long, 2005a) et est illustrée à la figure suivante.

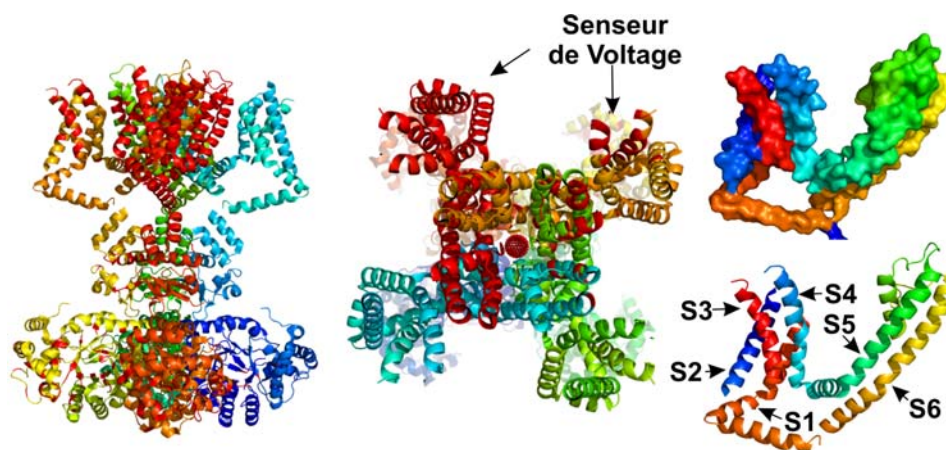


Figure 1.13. Structure cristalline Kv1.2.

À gauche, schématisation du tétramère Kv1.2 avec son domaine membranaire, son domaine de tétramérisation et la sous-unité bêta. Au centre, une illustration vue d'en haut du cristal Kv1.2. Les quatre domaines du senseur de voltage se retrouvent dans les coins entourant le pore. À droite, on observe le domaine transmembranaire d'une sous-unité avec ses 6 segments (S1-S4, le senseur; S5-S6, le pore). Construit à partir de 2A79.pdb.

L'alignement des séquences génétiques et l'homologie structurelle entre Shaker K⁺ et Kv1.2 démontrent que le domaine transmembranaire (Long, Tao *et al.*, 2007) et le domaine de tétramérisation (Chen et Roberts, 2000) sont conservés à plus de 90 % et 93 %, respectivement (Figure 1.14). Autrement dit, les résultats obtenus sur Shaker K⁺ en disent autant sur son comportement que sur celui de Kv1.2. D'ailleurs, toutes les régions putatives qui sont à l'étude sont conservées. Alors, la structure de Kv1.2 offre

une bonne référence pour étudier Shaker K⁺.

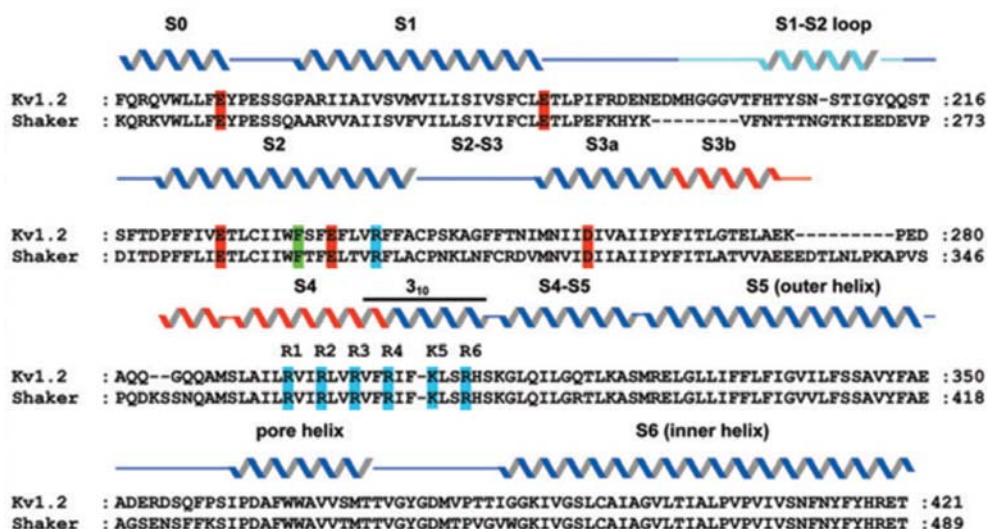


Figure 1.14. Séquence de Shaker.

L'illustration montre un alignement de séquence entre le canal potassique bactérien Shaker et son homologue dans la classe des mammifères Kv1.2. Adapté de (Long, Tao *et al.*, 2007).

Présentement, il existe d'autres structures cristallines de protéines membranaires parmi lesquelles on retrouve: la chimère Kv1.2/2.1, où le capteur de voltage fut résolu à 2.4 Å (Long, Tao *et al.*, 2007), la structure complète de Kv1.2 (Chen, Wang *et al.*, 2010), la structure d'un canal bactérien régulé par les nucléotides cycliques, MlotiK (Clayton, Altieri *et al.*, 2008), la structure d'un autre canal bactérien dans l'état « ouvert », MthK (Jiang, Lee *et al.*, 2002) et finalement, la structure du canal bactérien sensible au voltage responsable de la controverse sur les modèles de « gating », KvAP (Jiang, Lee *et al.*, 2003; Lee, 2005).

1.1.5.2. Caractéristique de la structure cristalline Kv1.2

La structure du canal Kv1.2 (provenant du rat) expose clairement les différentes interactions atomiques retrouvées à l'intérieur d'une même sous-unité (intrasous-unitaire) ainsi qu'entre différentes sous-unités (intersous-unitaire) du capteur de voltage.

Le segment S4 est entouré des hélices α S1 à S3, orientées antiparallèlement de façon à former une « vallée » qui protège partiellement les charges de S4 (Figure 1.15a). Les

hélices sont inclinées les unes contre les autres dans une structure de sablier et on remarque des crevasses où les molécules d'eau peuvent pénétrer profondément dans la membrane et proche du centre du VSD (Figure 1.15b). Ces crevasses sont délimitées par une région de quelques Ångström (5-10 Å) localisée au centre de la membrane et excluant la présence d'eau. Cette barrière est formée par une douzaine de résidus grandement conservés chez les canaux Kv, tel que la phénylalanine F290. Malgré la présence de cette barrière, l'agencement des segments transmembranaires du senseur de voltage fait ressortir une structure poreuse.

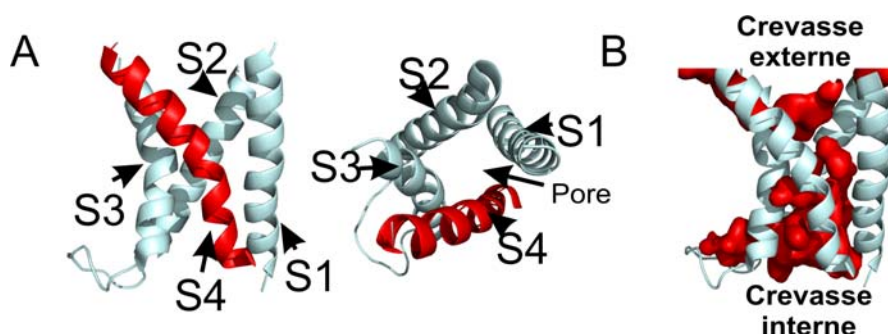


Figure 1.15. Illustration du senseur de voltage et de son pore.

(A) L'illustration montre l'orientation et l'interaction des segments S1-S3 (bleu pâle) avec le segment S4 (Rouge). À droite, on remarque le pore central. (B) Crevasse externe et interne (surface rouge). Construit à partir de 2A79.pdb.

Selon l'état dans lequel se trouve le VSD (fermé ou ouvert), une mutation des résidus délimitant les crevasses peut rendre celui-ci conducteur (Figure 1.16). Pour des mutations situées dans la région extracellulaire du segment S4 (R371 à R362), le senseur de voltage conduit ou transporte des anions lors de grandes dépolarisations (état ouvert) (Starace, Stefani *et al.*, 1997; Starace et Bezanilla, 2001;2004) tandis que pour d'autres mutations telles que R362C (Tombola, Pathak *et al.*, 2005b), I241H et I287H (Campos, Chanda *et al.*, 2007), il devient un transporteur à cations pour des potentiels hyperpolarisants (état fermé). Ce type d'étude est essentiel pour déterminer la position d'un résidu en fonction de l'état du VSD, et nous verrons à la fin de cette section comment cerner le senseur de voltage dans son état de repos.

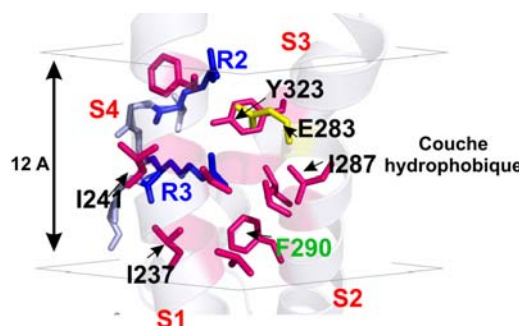


Figure 1. 16. Illustration de la couche hydrophobique.

Les acides aminés inclus dans la couche hydrophobique du senseur de voltage. Celle-ci a une épaisseur de 8 Å et est constituée de F290, I237, I241 et I287. Construit à partir de 3LUT.pdb.

La configuration des segments S1-S4 est stabilisée par les interactions électrostatiques et hydrophobes des acides aminés à l'intérieur d'une même sous-unité (Figure 1.17). Les interactions électrostatiques sont générées par les charges négatives des segments S1 et S3 et les charges positives du segment S4. Elles sont très importantes pour limiter la translocation du segment S4. Elles se divisent en deux groupes : le premier est exposé à la crevasse externe (résidus glutamates E247 (S1) et E283 (S2) (Tiwari-Woodruff, Lin *et al.*, 2000; Khalili-Araghi, Jogini *et al.*, 2010)) tandis que le second se retrouve dans un réseau d'acides aminés enfoui dans un milieu hydrophobe (E218 (S0), E293 (S2) et D316 (S3) (Papazian, Shao *et al.*, 1995; Papazian, Silverman *et al.*, 2002; Börjesson et Elinder, 2008)). Grâce à cette disposition, le déplacement de S4 est grandement restreint lors de l'ouverture/fermeture du canal. Les interactions observées à la figure 1.17 sont celles de K5 et R6 avec le groupement négatif interne, et R3 et R4 avec le groupement négatif externe. Cette combinaison, et le fait que la majorité des charges positives du segment S4 soient exposées vers le côté externe de la membrane, définit le statut du senseur Kv1.2 comme étant dans l'état ouvert.

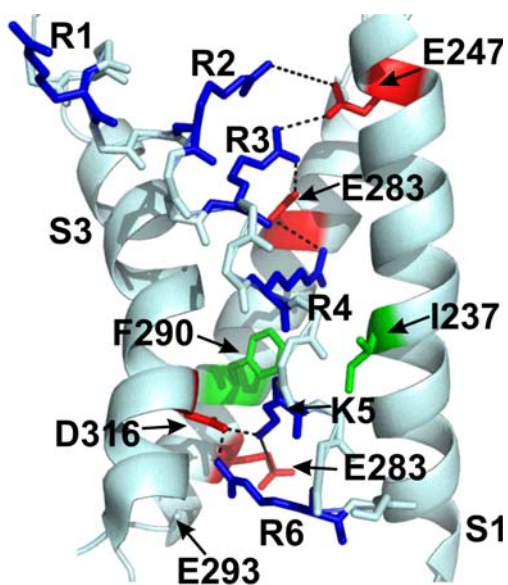


Figure 1.17. Les interactions du senseur de voltage.

Les charges positives (en bleu) interagissent avec les charges négatives (en rouge) pour stabiliser la structure dans l'état ouvert. Certains acides aminés sont impliqués dans l'occlusion du pore du senseur (en vert). Construit à partir de 2A79.pdb

Dans l'état ouvert, le segment S4 a une chiralité variable le long de son axe hélicale: du côté extracellulaire, on retrouve une hélice- α alors que côté intracellulaire, elle devient une hélice 3_{10} après le résidu R3 (R368) (Long, Tao *et al.*, 2007). Il a été suggéré que ce phénomène est causé par la résistance du pore lors de l'étirement du segment S4 durant le processus d'activation. Il en découle que cette résistance peut grandement affecter la conformation du senseur.

Il existe d'autres facteurs, absents de la figure 1.17, qui influencent aussi la stabilité globale du VSD. Les lipides ainsi que la périodicité des résidus hydrophobes (X) situés dans le même motif des charges positives du segment S4 (+, X, X, +, X, X...), participent à la modulation fonctionnelle du canal (Gandhi, 2002). Il a été également démontré que les têtes polaires des phospholipides interagissent avec les résidus du segment S4 (R1 et R2) situés à l'extrémité de la membrane (Cuello, 2004; Schmidt, Jiang *et al.*, 2006; Jogini et Roux, 2007; Long, Tao *et al.*, 2007) et leur rôle est essentiel dans la rapidité du mouvement du senseur (Tombola, Pathak *et al.*, 2006). Les arginines externes peuvent créer des ponts salins (Jogini et Roux, 2007) ou même des interactions électrostatiques (Ramu, Xu *et al.*, 2006; Xu, Ramu *et al.*, 2008; Milesco, Bosmans *et al.*,

2009) avec un milieu lipidique chargé négativement. Cette interaction permettrait à des substances lipophiles d'interagir et de réguler l'activité du senseur de voltage durant son activation. Ainsi, il est clair que la variation dans l'environnement lipidique modifie grandement l'activité cinétique et énergétique du canal.

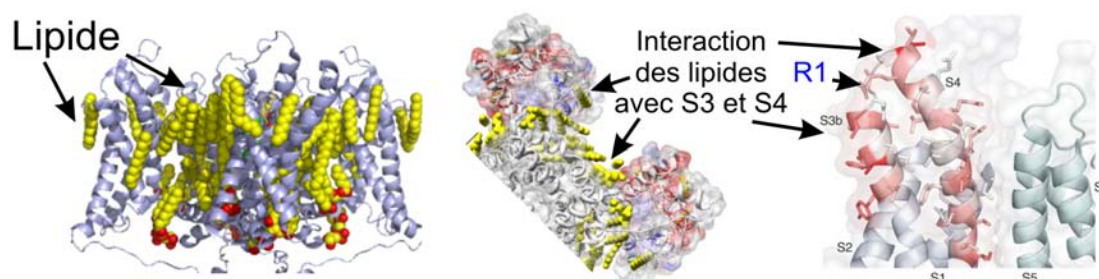


Figure 1.18. Les interactions lipidiques avec le senseur de voltage.

Les lipides (en jaune) interagissent avec les segments S3b et S4 du senseur de voltage (en rouge) de la structure chimérique Kv1.2/2.1. En bleu, on remarque que l'arginine R1 du segment S4 est exposée aux lipides et à la crevasse externe dans l'état ouvert. Adapté de (Chakrapani et Perozo, 2007; Milesco, Bosmans *et al.*, 2009).

Les résidus hydrophobes positionnés en (X) ont eux aussi un rôle très particulier dans la fonction des canaux Kv. Ils sont impliqués dans les interactions de type protéine-protéine et leur mutation a un grand impact sur la proximité protéinique (Li-Smerin, Hackos *et al.*, 2000; Schonherr, Mannuzzu *et al.*, 2002) et, par conséquent, sur le « gating » (Broomand et Elinder, 2008; Gonzalez-Perez, Stack *et al.*, 2010).

Chez les tétramères Kv, la première sous-unité du VSD s'agrippe de manière complémentaire autour de la sous-unité adjacente du pore (Figure 1.19). La liaison entre le pore et le VSD n'est donc pas seulement directe, mais implique des interactions entre les différentes sous-unités. Plusieurs méthodes expérimentales ont réussi à illustrer cette proximité (Elinder, Mannikko *et al.*, 2001; Broomand, Mannikko *et al.*, 2003; Gandhi, Clark *et al.*, 2003; Lainé, Lin *et al.*, 2003; Elliott, Neale *et al.*, 2004), dont celle de Diane Papazian, où elle démontre que les segments S4 et S5 de deux sous-unités différentes sont assez rapprochés pour former des liens disulfures. Par ailleurs, cette expérience a également démontré que le segment S4 est protégé de son environnement de tous les côtés.

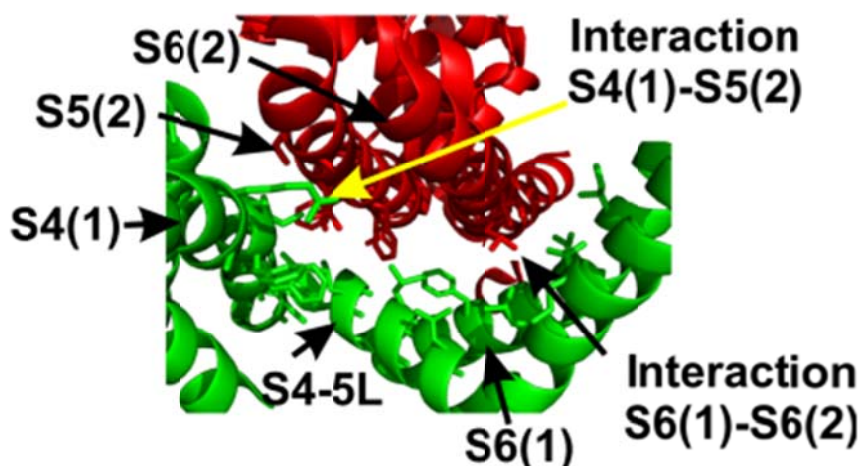


Figure 1.19. Interactions entre sous-unités.

L'illustration montre l'interaction entre deux sous-unités adjacentes. La sous-unité 1 (Vert) enveloppe la sous-unité adjacente (Rouge) créant plusieurs interactions entre le domaine du pore (2) et le senseur de voltage (1). On illustre les deux interactions dans une même sous-unité ainsi que l'hélice S4-5L reliant le senseur de voltage (1) au pore (1).

1.1.5.3. La localisation du champ électrique

Les crevasses entourant le senseur de voltage furent discutées pour la première fois en 1996 et mises en évidence grâce à des études d'accessibilité aux agents méthylthiosulfonate (MTS) (Goldstein, 1996; Larsson, Baker *et al.*, 1996; Yang, George *et al.*, 1996; Yusaf, Wray *et al.*, 1996; Baker, Larsson *et al.*, 1998; Wang, Yusaf *et al.*, 1999). La présence de ces creux aqueux est déterminante dans la localisation du champ électrique. La variation de l'épaisseur membranaire au niveau des crevasses a pour effet d'élever la constante diélectrique et de réduire la distance à travers lequel le potentiel membranaire chute sur S4. Plus la séparation est courte, plus grand devient le champ électrique local dans la région S4. L'effet des crevasses est donc de concentrer le champ électrique au niveau de la couche hydrophobe (Islas et Sigworth, 2001; Asamoah, Wuskell *et al.*, 2003; Ahern et Horn, 2005) et d'imposer une plus grande force d'interaction sur le segment S4 (Keynes et Elinder, 1999). Par conséquent, le nombre de charges négatives nécessaires à la stabilisation du VSD lors de la translocation du S4 est diminué (Yang, George *et al.*, 1996). En sachant la force locale appliquée par le champ électrique, on peut déterminer la distance de translocation maximale du segment S4 lors de son mouvement de charges durant le « gating ».

1.1.5.4. Les modèles conceptuels

Le premier modèle conceptuel a été suggéré avant même que Shaker K⁺ ne soit cloné, lorsque Armstrong a présenté le modèle du « sliding helix » (Armstrong, 1981), très similaire à celui connu aujourd'hui comme le « helical screw model » (Figure 1.20b) (Catterall, 1986; Guy et Seetharamulu, 1986; Lecar, Larsson *et al.*, 2003; Durell, Shrivastava *et al.*, 2004). Selon ce modèle, pour bouger les charges à travers le champ électrique, le segment S4, incliné de 37° en référence à l'axe de la membrane, tourne d'un angle de ~180° degré en se déplaçant de ~ 11 Å le long de son axe principal (Figure 1.20A) (Durell, Hao *et al.*, 1998; Keynes et Elinder, 1999; Gandhi, 2002). Ces mesures sont le fruit d'une analyse par « Förster Resonance Energy Transfer » (FRET) (Posson, Ge *et al.*, 2005; Tombola, Pathak *et al.*, 2005a; Tombola, Pathak *et al.*, 2006) qui a amené à comparer la distribution des arginines sur S4 à une enseigne de barbier. Ce déplacement hélicoïdal du segment S4 est représenté par un enchainement de trois étapes consécutives où, parallèlement, une charge électronique (~1e) se transporte par transition. Les étapes sont stabilisées dues à l'appariement entre les charges positives (R1-K5) en mouvement et les groupes de charge négative interne et externe (Schoppa, McCormack *et al.*, 1992; Aggarwal et MacKinnon, 1996; Seoh, Sigg *et al.*, 1996; Catterall, 2010; Khalili-Araghi, Jogini *et al.*, 2010).

Le « transporter model » (Figure 1.20c), proposé par Papazian et Bezanilla en 1997, suggère que dans l'état fermé, les arginines du S4 soient en contact avec la crevasse intracellulaire et que lors de la transition à l'état ouvert, elles subissent une rotation de 180°, rejoignant ainsi la crevasse externe (Cha, Snyder *et al.*, 1999; Bezanilla et Perozo, 2002; Elinder et Arhem, 2003; Blaustein et Miller, 2004; Starace et Bezanilla, 2004; Chanda, Asamoah *et al.*, 2005). Selon certaines études, le *canaliculus* (S1-S3) (Goldstein, 1996) subit aussi un certain changement conformationnel qui favorise l'état ouvert (Yang, George *et al.*, 1996). Ce modèle préconise que le mouvement de translation du segment S4 est moindre en comparaison du « helical screw model ». Cependant, tous deux proposent que le transfert de charges se fasse principalement via un changement de conformation rotationnel (Glauner, Mannuzzu *et al.*, 1999; Chanda, Asamoah *et al.*, 2005; Posson, Ge *et al.*, 2005).

Dans le cas du « paddle model » (Figure 1.20d) basé sur la structure cristallographique de KvAP (Jiang, Lee *et al.*, 2003), le mouvement du senseur de voltage serait beaucoup plus extensif et atteindrait une amplitude de ~ 20 Å (Jiang, Lee *et al.*, 2003; Ruta, Chen *et al.*, 2005), et pourrait se promener librement dans les lipides, tel un « cation hydrophobe ». Ce modèle a suscité une longue controverse chez les biophysiciens, et a été critiqué dans de nombreuses publications (Broomand, Mannikko *et al.*, 2003; Cohen, Grabe *et al.*, 2003; Lainé, Lin *et al.*, 2003; Ahern et Horn, 2004; Broomand et Elinder, 2008). Cependant, l'auteur de ce modèle, Roderick MacKinnon, prix Nobel de chimie 2005, en a reconnu publiquement sa désuétude lors d'une conférence en 2010 (Annual Biophysical Society Meeting). Avec l'amélioration des techniques d'investigation, les modèles convergent tous de plus en plus (Tombola, Pathak *et al.*, 2007) vers un prototype qui supporte la rotation de $\sim 180^\circ$ et l'interaction électrostatique entre les charges appariées.

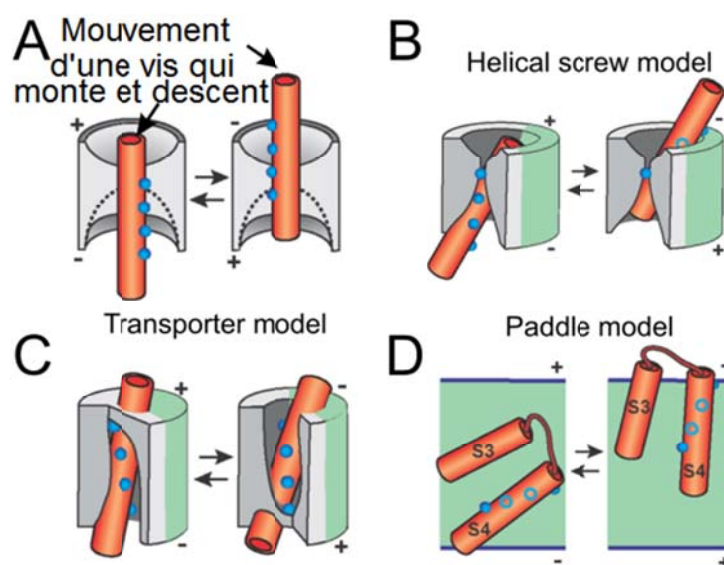


Figure 1. 20. Modèles décrivant le mouvement du segment S4 entre l'état ouvert et fermé.

Les arginines R1-R4 (bleu) sont schématisées en boules longeant le segment S4 (orange). Le mouvement de S4 est représenté par « le helical screw model » (B), le « transporter model » (C), le « paddle model » (D). Adapté de (Tombola, Pathak *et al.*, 2006).

Les divergences d'opinions entre les modèles conceptuels se justifient par le manque de structure cristalline résolue dans l'état fermé. La cause primaire de cette lacune est l'incapacité d'imposer un voltage lors de la cristallisation d'une protéine. Par défaut, les

canaux sont cristallisés en absence de champ électrique (0 mV) et se retrouvent généralement dans un état ouvert (activé ou inactivé). Toutefois, il existe une structure cristalline d'un domaine très similaire à celui du senseur de voltage dans l'état de repos. MlotiK1 (Clayton, Altieri *et al.*, 2008) est un canal régulé par des nucléotides cycliques composé de six segments transmembranaires distribués similairement aux canaux Kv. À l'aide de la structure de ce canal, les interactions coordonnant l'état fermé du senseur ont pu être modélisées.

D'ailleurs, les investigations de la couche hydrophobique mentionnée précédemment, confirment certaines interactions coordonnant l'état fermé. Il a été démontré que la mutation de R1 et de R4 en histidine et en cystéine respectivement produit un courant protonique dans l'état fermé, chaque fois que le senseur s'active et se désactive (Figure 1.21 à droite). Ces résultats confirment que les arginines R1 et R4 échangent de position lorsque le VSD passe de l'état fermé à l'état ouvert.

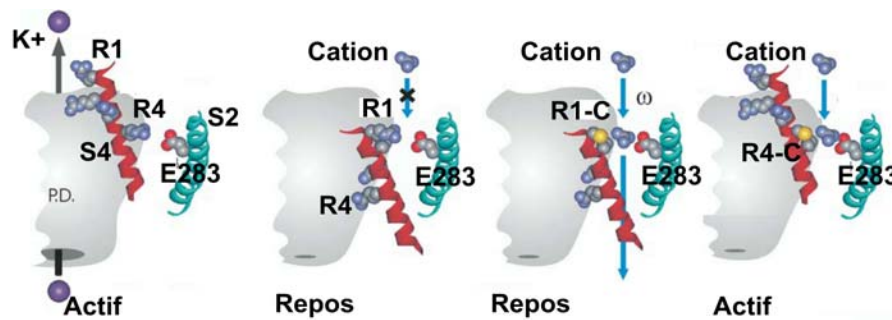


Figure 1.21. Les courants du senseur de voltage.

À gauche, le canal est dans son état actif et R4 interagit avec E283. Au repos, les cations ne peuvent pas passer car R1 agit comme un bouchon. La mutation de R1 en Cystéine permet le passage de cations (H^+) à travers le senseur de voltage dans l'état fermé. De même pour les mutations R4-C dans l'état ouvert. Adapté de (Tombola, Pathak *et al.*, 2005b).

De plus, ces arginines formeraient un bouchon dans la région hydrophobe séparant les deux crevasses dans l'état ouvert et pointeraient vers la région protéique non hydrophobe dans l'état de repos (Tombola, Pathak *et al.*, 2005b). Afin de schématiser la transition entre l'état fermé à l'état ouvert on se réfère à la Figure 1.22

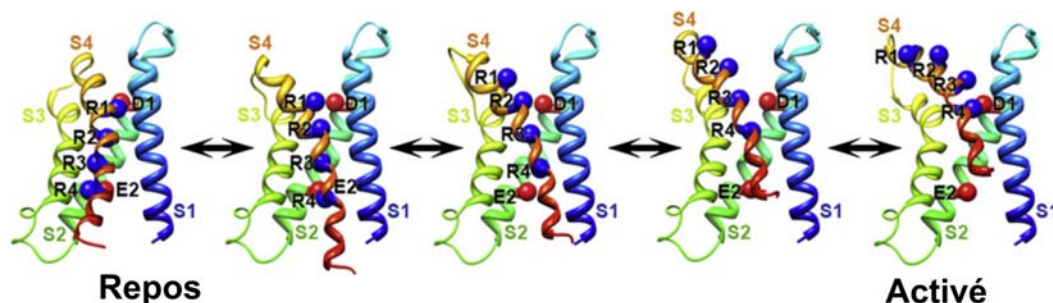


Figure 1.22. Le modèle coordonné entre l'état de repos et l'état activé du senseur de voltage.

(A) Étapes de translocation du segment S4 entre les deux états métastables. En bleu, les arginine et en rouge, certains résidus chargés. Les résidus hydrophobes (I325 et V369) ne sont pas illustrés. Adapté de (Catterall, 2010). Incluant tout ce qui a été présenté, le modèle coordonné se définit ainsi : dans l'état fermé, R1 est stabilisé par E283 sur S2, R2 par E293 sur S2 et D316 sur S3a, I360 ainsi que I325 sur S4 sont proches de I325 sur S3b. Dans l'état ouvert, R1 et R2 baignent dans la crevasse et interagissent avec les charges négatives des phospholipides, R3-R4 interagissent avec E283 sur S2 et E247 sur S1, K5 entre en contact avec E293 et D316, de plus V369 et L366 se lie à I325.

Nous avons maintenant une certaine compréhension de l'identité moléculaire, du mécanisme physique du « gating » et du mécanisme réagissant le voltage chez les canaux Kv. Nous allons maintenant aborder certaines notions nécessaires pour décrire les mécanismes impliqués dans le couplage électromécanique.

1.2. Les propriétés biophysiques des canaux potassiques

Pour déterminer les propriétés biophysique des canaux potassiques voltage-dépendants, il est essentiel de pouvoir contrôler les différentes conformations responsables de sa fonction. Les propriétés électriques du senseur de voltage simplifient grandement cette tâche. En fait, pour y parvenir on utilise l'électrophysiologie par voltage imposé (Annexe 1 et 2); une méthode spécialisée qui permet d'imposer un champ électrique à travers une membrane. Une grande partie de ce que nous savons sur les propriétés des canaux ioniques dans les membranes cellulaires vient de ce type d'expérience.

Dans la section précédente on a mentionné que le canal de Shaker K⁺ peuvent facilement être surexprimés dans un système cellulaire. Alors, prenons le cas d'un ovocyte de *Xenopus laevis* (methodologie) qui surexprime Shaker K⁺ en conditions physiologique et « clampé » par un voltage imposé à deux microelectrode (« Twin

electrode Voltage » (TEV) ; Annexe 2). Dans ces conditions le potentiel de repos est à -90 mV. Alors pour stabiliser les canaux dans l'état fermé on impose un voltage de maintien (« holding potential » (HP)) à -90 mV. De là, on dépolarise la bicouche à un voltage positif pendant 30 ms et on revient de nouveau à ce voltage de maintien. Qu'observons-nous? On obtient le courant membranaire suivant ;

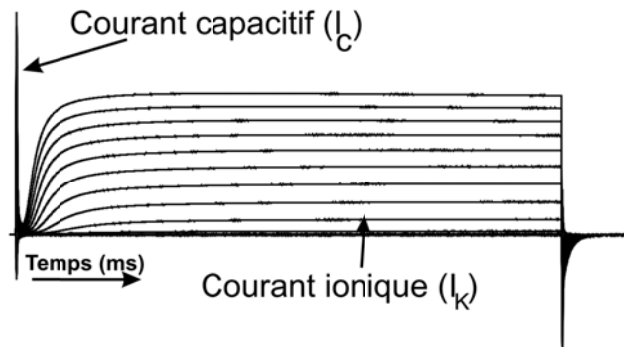


Figure 1.233. Courant mesuré par voltage imposé.

L'illustration présente la forme du courant ionique K⁺ lorsqu'on applique un protocole de pulse (-120mV à 50 mV). Le potentiel de maintien est de -90 mV.

Cette mesure regroupe un courant capacitif (I_c), un courant de fuite (I_{fuite}) et un courant ohmique saturant (I_K). Ce dernier correspondant au mouvement des ions à travers les canaux K_v. Puisque ces courants sont en parallèle, mathématiquement on peut exprimer cette somme comme suit

$$I_M = I_{K^+} + I_c + I_{fuite} = G_{K^+}(V_M - E_{eq.K^+}) + C_M \frac{dV}{dt} + I_{fuite} \quad (1.1)$$

Où C_M est la capacitance membranaire et E_{eq} le potentiel à l'équilibre du K⁺. Au moment du pulse la variation dV/dt est maximal, ensuite dès que la différence de potentiel s'égalise au potentiel imposé, le courant décroît en amplitude. Après quelque msec, le seul courant mesuré est le courant ionique potassique contaminé d'un courant de fuite. Alors où se trouvent les charges de « gating » ?

De ce qui a été mentionné précédemment, le fait que les charges de « gating » contrôlent l'activation des canaux K_v et par conséquent le courant ionique mesuré, la translocation de ces charges doit précéder le courant ionique. En effet, le courant de « gating » est contaminé par le courant ionique et capacitif. Alors, comment fait-on pour le mesurer?

Il à été mentionné au tout début de cette introduction que la conductance ionique d'un seul canal Kv est proche de 11ps. Cela équivaut à un flux de 10^7 ions par seconde pour un V_m de -30 mV. En comparaison, la quantité de charges bougée lors de l'activation d'un canal est de $13.6 e_0$. Autrement dit, le courant de « gating » devient impossible à mesurer dans les conditions ou la conductance est présente et contrôlée (clamp de $10 \mu\text{A}$) (Bezanilla, 2000).

Pour se faire il est possible de surexprimé le canal Kv et ensuite de bloquer le pore avec des toxines (charibdotoxine, CTX) et des agents inhibiteurs (tetraethylamoniom, TEA) ou même tout simplement modifier les concentrations ioniques de part et d'autre de la membrane. À ces méthodes s'ajoute la mutagenèse dirigée (Méthodologie). En 1993, Perozo et al. on identifié une position (434, Shaker) impliqué dans la stabilité du filtre de sélectivité que lorsque mutée en phénylalanine (W→F), la conduction ionique disparaît, mais garde le processus de « gating » intact (Perozo 1993). Cette mutation est le procédé utilisé dans cette étude pour étudier le « gating » macroscopique, elle permet de détecter le changement de conformation entre les états fermé en condition physiologique. La figure 1.24 illustre le « gating » de Shaker K^+ exprimé dans un ovocyte clampé par voltage imposé. Pour visualiser le courant transitoire, la densité d'expression doit être énorme, soit d'environ $3000 \text{ canaux}/\mu\text{m}^2$ (Bezanilla, 2000). La cinétique de ce courant sera élaborée plus en détails (l'objectif de cette recherche) dans la section 1.3 lors de l'introduction des modèles cinétiques.

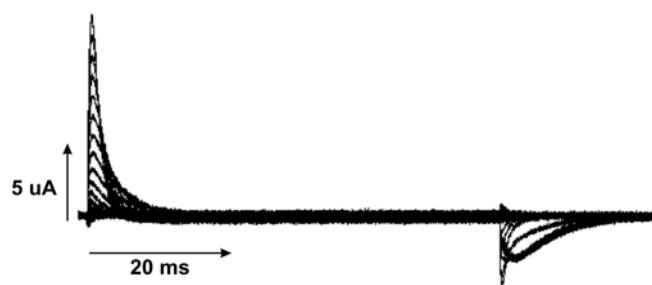


Figure 1.24. Courant de Gating de Shaker K^+ .

L'illustration présente la forme du courant de « gating » de Shaker K^+ lorsqu'on applique un protocole de pulse (-120mV à 50 mV). Le potentiel de maintien est de -90 mV.

La capacité de mesurer ces courants offre une validation sur le fait que les transitions dépendantes du voltage sont bel et bien dues au mouvement de charge à travers la membrane. En effet, chaque charge qui se déplace lors de la dépolarisation contribue au courant de « gating ». À la figure 1.24, on observe deux cinétiques, une rapide qui apparaît lors de la dépolarisation, surnommée le « ON-gating » et une plus lente qui surviennent lors de la repolarisation, le « OFF-gating ». Le comportement transient (résolu dans le temps) est dû au fait que les charges adoptent une certaine conformation d'équilibre dans le champ électrique et cesse de bouger après un certain temps. Le courant est tel que

$$I_g = \frac{dq}{dt} \quad (1.2)$$

et l'intégrale sur le temps du courant de « gating » pour un voltage spécifique nous donne la charge totale transposée à la surface de l'ovocyte (« gating charge ») $Q(V)$.

$$\int I_{g(V)}(t)dt = \int \frac{dq}{dt} dt = Q_V = N \sum_i q_i \delta_i \quad (1.3)$$

La quantité de charges totales en fonction du voltage, $Q-V$, se trace-t-elle aussi par une sigmoïde avec des asymptotes pour des potentiels extrêmes (Figure 1.25). À ces voltages, la charge s'est déplacée à une position maximale où elle ne peut plus bouger (l'état activé et l'état au repos).

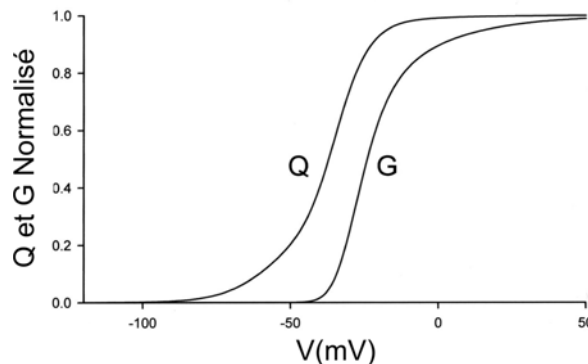


Figure 1.245. $Q-V$ vs $G-V$.

Cette figure illustre la dépendance de la charge totale (Q) et de la conductance (G) en fonction du voltage. Leur proximité se relie intimement au couplage électromécanique. Adapté de (Bezaniilla, 2000).

Avec ces notions nous pouvons finalement corrélérer le « gating » à la conductance en fonction de voltage. Ce type de mesure nous permettra de comprendre comment l'énergétique du couplage est affectée lorsqu'on introduit des mutations dans notre système.

1.3. Le mécanisme de « gating » et son modèle cinétique

L'ensemble des notions présenté dans la section précédente identifie les canaux potassiques de type Shaker K⁺ comme des protéines constituées de plusieurs états fermés (Hodgkin et Huxley, 1952c; Cole et Moore, 1960). Il est possible de quantifier ces états par l'intermédiaire des courants de « gating » macroscopique. Le « gating » est une excellente option pour étudier le couplage électromécanique entre le pore et le senseur de voltage. À cause que le mouvement du senseur est directement couplé au pore, les transitions que le canal subit durant le couplage électromécanique sont directement reflétées dans les courants de « gating ». D'ailleurs, la pertinence de ce courant réside dans le fait que sa mesure est proportionnelle aux taux de déplacement de charge de toutes les transitions qui transporte des charges dans la voie d'activation. Alors, son étude est cruciale à notre recherche.

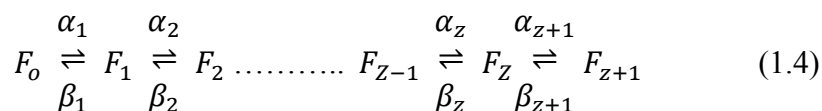
L'étude du « gating » veut tout simplement suggérer l'interprétation cinétique et énergétique des transitions de charge totale Q . Souvent pour modéliser les résultats on élabore des diagrammes d'états cinétiques pour représenter le poids des transitions entre les différents états fermés et l'état ouvert. Alors, pour assurer une bonne compréhension du « gating » ainsi que du modèle utilisé, la section suivante introduit les bases cinétiques et certaines notions sur les transitions d'états.

1.3.1. Le modèle de Markov

Les critères de cinétique utilisés pour déterminer la multiplicité des états fermés viennent des hypothèses définies par la cinétique classique. L'hypothèse primaire fut introduite par Andrei Markov. Elle explique que les taux de transitions entre des états consécutifs sont totalement indépendants de leur historique (sans mémoire). Autrement dit, c'est un processus stochastique. Cela signifie que la distribution de probabilité des états à venir ne dépend en fait que de l'état présent et non des transitions précédentes. Donc, la connaissance du passé ne permet aucunement à la prédiction du futur. Cette hypothèse repose sur les critères de Markov et définit les transitions d'états comme des processus de Markov.

Considérons la situation où l'on dépolarise une membrane. Si on mesure la cinétique d'une courbe (« gating » ou conductance), et on observe Z temps de relaxation, d'après les hypothèses de Markov, ce dernier doit contenir un minimum de $Z + 1$ état (Sachant qu'on ne peut pas observer tout les états) (Colquhoun et Hawkes, 1977;1982;1995).

$$I(t) = D_0 + D_1 e^{\left(\frac{-t}{\tau_1}\right)} + D_2 e^{\left(\frac{-t}{\tau_2}\right)} + \dots + D_{Z-1} e^{\left(\frac{-t}{\tau_{Z-1}}\right)} + D_Z e^{\left(\frac{-t}{\tau_Z}\right)} + D_{Z+1} e^{\left(\frac{-t}{\tau_{Z+1}}\right)}$$



où les τ_i représentent les constantes de temps et D_i le poids de l'amplitude. Malgré la simplicité derrière cette théorie, généralement les constantes de temps ne sont pas si aisément isolées. En effet, dans les courants macroscopiques (stochastique), chaque τ isolé correspond à une combinaison pondérée de toutes les constantes de temps du système (Wyllie, Behe *et al.*, 1998). Cela découle de la présence d'une quantité innombrable de sous-états fermés entre les états globaux fermé (Conti, De Felice *et al.*, 1975). Le critère permettant de les discriminer repose sur la rapidité de leur transition. Alors souvent la question à se poser est : est-ce que les états considérés sont temporellement bien résolus pour être discriminés? Cela dépend grandement de la précision (résolution) du système de mesures ainsi que de sa réponse fréquentielle (Hodgkin, Huxley *et al.*, 1952). Donc, dans le cas du « gating » on se concentre sur les états qui sont mesurables même si les sous-états entre chaque état fermé contiennent énormément d'information.

Maintenant, comment valider un diagramme d'états? Tout simplement en considérant que le système repose sur les taux permissifs (les états mesurables) et sur la structure de l'objet en soi (le mouvement dans une sous-unité doit être répété dans toutes les sous-unités). Alors, sachant que l'oligomérisation des canaux Kv est tétramérique, il a été établi que le modèle le plus approprié pour définir le diagramme de transition du « gating » est un modèle à quatre états ou les senseurs sont indépendants et se distribuent entre un état au repos (R) et un état actif (A) (Figure 1.26) (Hodgkin et Huxley,

1952d;c;a).

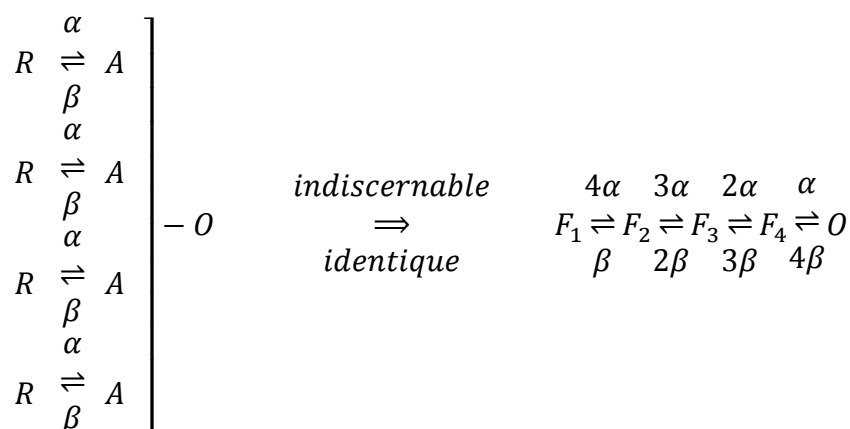


Figure 1.25. Un modèle séquentiel.

On remarque l'addition de la pondération des taux de transition, $4\alpha\dots$ et $4\beta\dots$. Ce cas ne reflète pas l'exemple utilisé dans notre étude. Il est présenté pour montrer l'influence que les taux de transitions peuvent avoir sur les modèles. On remarque que plus ils se rapprochent de l'état ouvert plus le taux de transition décélère (O)(Hille, 2003).

Cette conceptualisation donne un total de 15 fermés états possible (Figure 1.26 gauche). Cependant, l'indépendance entre les sous unité, tel que présentés par HH (Hodgkin et Huxley), permet de regrouper les états RRRA, RRAR, RARR, ARRR puisque la cinétique observée entre ses états est identique (Armstrong, 1969). Tous les états avec un même nombre d'états fermés sont indiscernables et peuvent être jumelés (Figure 1.26 droite). Ce modèle (F1, F2, F3, F4, O) est, depuis, l'idée de base sur laquelle reposent les dizaines d'autres modèles développés. Zagotta, Hoshi et Aldrich ont un modèle de 14 états jumelés, précédant l'ouverture (où chaque senseur de voltage comporte deux états de repos, R1 et R2). Aussi Schoppa et Sigworth (1998a, b) ainsi que Zheng et Sigworth (1998) ont proposé d'autres possibilités très valides pour caractériser le comportement du « gating ».

1.3.2. Les caractéristiques cinétiques et énergétiques du « gating »

La mesure du courant de « gating » est une méthode bien développée permettant, par l'intermédiaire du courant électrique, de mesurer des transitions entre les états fermés. Dans la section 1.2 on a expliqué que la relation Q-V (Figure 1.25) représente le déplacement de charges en fonction du voltage. Lorsqu'on représente cette sigmoïde par

une somme de Boltzmann (un modèle de trois états séquentiels), on remarque qu'elle comporte deux composantes, l'une associée à une quantité de charges $Q_{(1)}$ et l'autre à $Q_{(2)}$. Le $V_{1/2}$ de la première composante est d'un voltage plus négatif avec une plus petite charge transportée (V_s grand) tandis que l'autre se situe vers des voltages plus dépolarisés et possède une plus grande charge transportée (V_s petit, dû à une plus forte dépendance au voltage). (Bezanilla 1994). Cette séparation explique la présence de différentes transitions fermés qui évoluent selon différents voltages.

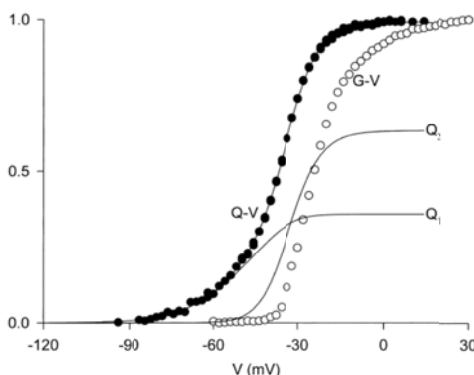


Figure 1.26. $Q-V(ON)$: Distribution des charges.

Cette figure illustre les deux composantes Q_1 et Q_2 (ligne droite) par un fit de deux Boltzmann de la $Q-V$ (point noir). La $G-V$ est illustrée par les points blancs. Adapté de (Bezanilla, 2000)

Par ailleurs, il a été démontré que la phase d'atténuation du « ON-gating » (Figure 1.28) illustre un comportement variable selon la dépolarisation membranaire. Pour des petites dépolarisations (-60 mV), le comportement est défini par une seule exponentielle, pour des dépolarisations intermédiaires (-50 et -40 mV) elle se caractérise par une somme de deux exponentielles et pour de grandes dépolarisation (-20 mV) elle redevient mono-exponentielle (Perozo, MacKinnon *et al.*, 1993; Stefani, Toro *et al.*, 1994). Que signifie ce comportement? En tenant compte des deux transitions décrites par la $Q-V$, la cinétique du transfert de charge se fait elle aussi à travers deux groupes de transition, l'une tôt et l'autre plus tard dans le diagramme séquentiel. Alors, le transport de charge est défini par deux groupes de transition (composante exponentielle), où la première composante domine à de petits voltages. Durant des dépolarisations intermédiaires le deuxième groupe de transition commence à se manifester, ainsi la seconde composante augmente d'amplitude et sépare les exponentielles. Pour les grandes dépolarisations, la deuxième composante domine l'amplitude due à l'ampleur de sa quantité de charges

transférées par rapport à la première transition. Ainsi, Q2 domine l'atténuation.

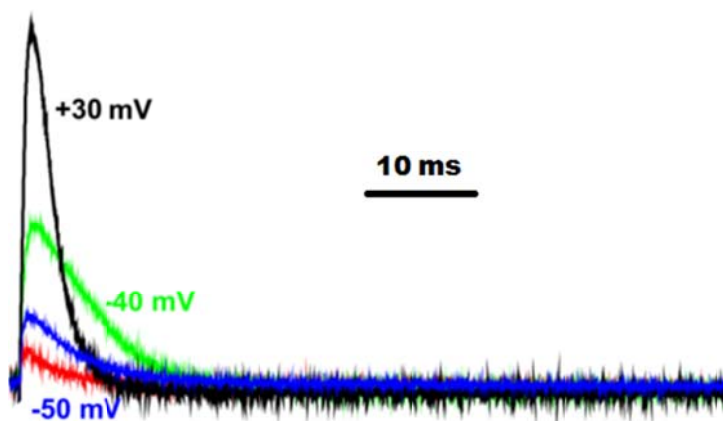


Figure 1.27. Caractéristique du « ON-gating ».

En ce qui concerne la phase ascendante du « On-Gating », elle indique qu'il existe un autre groupe de charges transportées dans le diagramme séquentielle. Donc, par l'analyse de l'énergie et de la cinétique du système on réussit à démontrer l'existence d'un minimum de 3 ensembles de transition.

En revanche, le courant du « OFF-gating » (Figure 1.29) est décrit par les caractéristiques saillantes suivantes. Pour de petites dépolarisations (activation partielle) les courants sont rapides (-50 mV). Toutefois pour des dépolarisations intermédiaires (-30 et -40 mV), le courant montre deux types de composantes, l'une rapide comme pour de petites dépolarisations suivies d'une autre très lente (Perozo, MacKinnon *et al.*, 1993; Stefani, Toro *et al.*, 1994). Pour des dépolarisations très grandes (complètes), les composantes se manifestent par un « OFFSET », une phase ascendante prononcée avec une atténuation très lente vers l'état de repos. Le potentiel auquel ce phénomène se manifeste correspond exactement au potentiel où la conduction ionique apparaît, indiquant que la quantité de charges est ralentie lorsqu'elle atteint l'ouverture (Bezánilla, 2000).

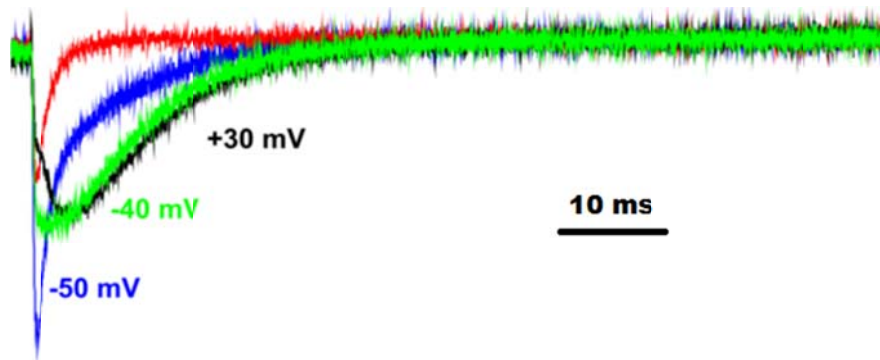


Figure 1.28. Caractéristique du « OFF-gating ».

Par l'interprétation de ces résultats, plusieurs chercheurs ont dévoilé que les premières transitions dans le modèle séquentiel d'activation représentent des événements rapides et facilement réversibles pour un senseur, alors que les transitions survenant plus tard dans le diagramme d'état précédant l'activation complète des canaux sont des transitions lentement réversibles et susceptibles de représenter une transition impliquant toutes les sous-unités (Figure 1.30 (K_5)) (Tagliatalata, Kirsch *et al.*, 1992; Bezanilla, Perozo *et al.*, 1994; Loboda et Armstrong, 2001).

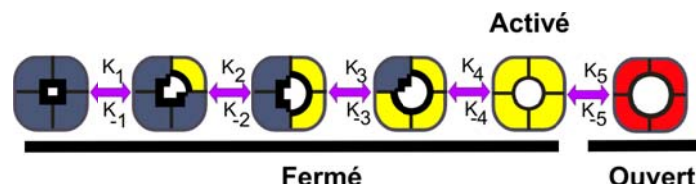


Figure 1.290. Modèle séquentielle de notre étude.

Ce modèle représente une séquence d'état où les transitions K_1 à K_4 représentent la quantité de charges Q_1 (tôt, petite, rapide et réversible), et K_5 le mouvement de charge Q_2 (tard, grand, difficilement réversible, favorable à l'état ouvert). Puisque cette dernière transition implique toutes les sous-unités, elle est parfaite pour mieux comprendre la coopérativité entre chaque sous-unité, qui est essentiellement l'objectif du premier projet.

Maintenant que les notions de « gating » sont éclaircies, on peut finalement introduire le couplage électromécanique qui est l'objectif du deuxième projet.

1.4. Le couplage électromécanique

Le couplage électromécanique est le mécanisme qui décrit comment le mouvement du senseur de voltage est couplé au pore de conduction. L'étude combinée du « gating » et de la conductance permettra d'élaborer un modèle cinétique pour ensuite corrélérer leurs comportements énergétiques. Il sera question de déterminer des hypothèses permettant de décrire les effets qu'aura le découplage sur la cinétique et l'énergétique du « gating ». En effet, à l'aide du modèle proposé et de la compréhension des cinétiques observées par le « gating » (section 1.3), l'altération de certains sites putatifs en référence à la structure cristalline Kv1.2 par l'introduction de mutation dirigée (Méthodologie) permettra d'élucider ce mécanisme encore irrésolu chez les canaux Kv. Un survole rapide des hypothèses et des études propres au couplage sera présenté avant de décrire les objectifs du mémoire.

1.4.1. Interaction entre S4-5L et S6

Précédemment, on a montré la séquence de Shaker K⁺ (Figure 1.14) et on a défini les deux complexes évolutifs : le pore et le senseur. D'après la séquence et la structure (Figure 1.31), le domaine de conduction, délimité par les segments S5-S6 (394-489), est relié au senseur de voltage (S1-S4 : 219-380) par le segment nommée S4-5L (380-393). Cette intermédiaire est composée de 12 acides aminés hautement conservés, orientés parallèlement à la couche phospholipidique interne (Long, 2005a). Ce segment est essentiellement à l'origine du couplage électromécanique.

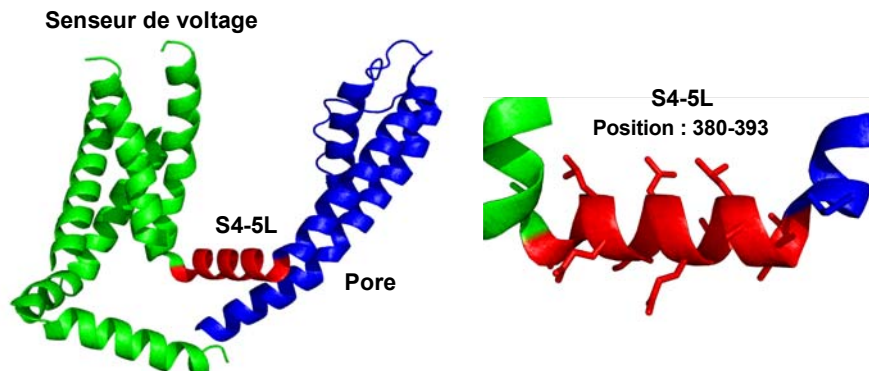


Figure 1.301. Le lien covalent S4-5L.

En vert on observe le senseur de voltage, en rouge le lien S4-5L et en bleu le pore.

La découverte qui fut l'élément déclencheur de la course au couplage électromécanique est attribuée au laboratoire de Zhe Lu, University of Pennsylvania (Figure 1.32). L'ingéniosité de ce groupe de recherche a permis de démontrer que les structures responsables du couplage entre le domaine du senseur de voltage et celui du pore sont essentiellement la complémentarité du segment S4-5L au segment S6. À l'aide de leur chimère (Lu, 2002), ils ont prouvé que pour sensibiliser un canal K⁺ indépendant du voltage, constitué de segment S5 et S6 tel que KcsA (TM1-TM2), il fallait transférer le senseur de voltage avec le segment hélicale S4-5L ainsi que le domaine interne du segment S6 (C-terminal) d'un même canal (Shaker K⁺) au canal KcsA pour permettre à ce dernier de devenir sensible au voltage, développant ainsi un couplage artificiel (chimérique). Cette nécessité conjointe d'avoir ces deux structures a établi indirectement les bases du couplage. Par contre, les bases structurales du couplage restaient toujours à déterminer.

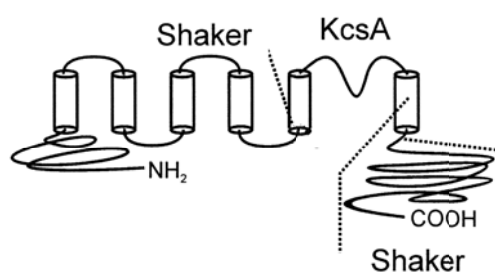


Figure 1.31. La chimère Shaker K⁺/KcsA.

Adapté de (Lu, 2002)

La structure cristalline de Kv1.2 montre clairement que le segment S4-5L se situe très proche du « helical bundle crossing » (section intracellulaire du segment S6) de la même sous-unité (interaction intra sous-unité) et que de la même structure de l'unité adjacente (interaction inter sous-unitaire). Il en découle qu'il est évident que ces deux segments interagissent ensemble due à la proximité et l'orientation de leur résidu (Long, 2005b). Cependant quels sont les résidus responsables de ce couplage? Plusieurs études en électrophysiologie ont démontré que la modification de certains résidus de S4-5L (Isacoff, Jan *et al.*, 1991; McCormack, Tanouye *et al.*, 1991; Slesinger, Jan *et al.*, 1993; Sanguinetti et Xu, 1999; Chen, 2001; Lu, Klem *et al.*, 2001; Tristani-Firouzi, Chen *et al.*, 2001; Decher, 2004; Caprini, Fava *et al.*, 2005; Labro, Raes *et al.*, 2008) et S6 (Liu, Holmgren *et al.*, 1997; Schoppa et Sigworth, 1998b; Hackos, Chang *et al.*, 2002; Yifrach et MacKinnon, 2002; Sukhareva, 2003) situé proche de cette interaction affecte

énormément le couplage (Figure 1.33). Cette conclusion générale est reflétée par la modification de l'activation du « gating » due à la perte de stabilité de l'état ouvert (faible P_O).

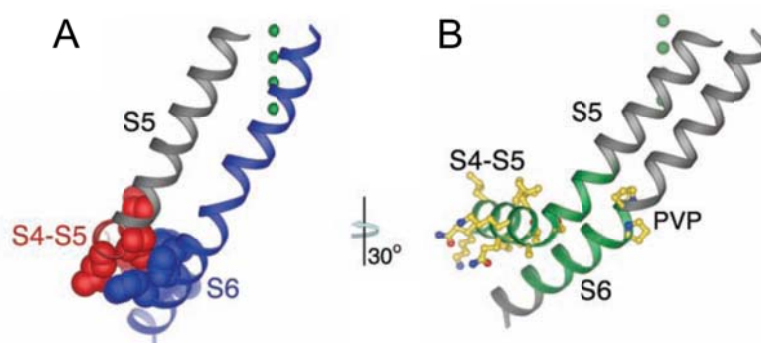


Figure 1.323. Le couplage électromécanique.

En (A) on observe une région d'intérêt qui définit le couplage électromécanique. En rouge, le lien S4-5L et en bleu S6. En (B) on observe la proximité du segment PVP de S6, au segment S4-5L. Adapté de Long et al, 2005.

1.4.2. Le découplage en voltage imposé : hypothèse énergétique et cinétique

Le découplage s'identifie comme un affaiblissement de la réponse directe entre le senseur de voltage et le pore. Autrement dit, la conductance perd sa grande dépendance sur le voltage et elle requiert plus d'énergie (une plus forte dépolarisation) pour l'ouvrir. Par rapport à une courbe G-V, cela se traduit par un déplacement de la courbe ($V_{1/2}$) vers de plus grandes dépolarisations ($V_{1/2 \text{ Mutant}} > V_{1/2 \text{ WT}}$). En revanche, le comportement de la Q-V se déplacera vers de moins grandes dépolarisations ($V_{1/2 \text{ Mutant}} < V_{1/2 \text{ WT}}$) (Figure 1.34). Il en découle qu'on vise à obtenir un $\Delta V_{1/2 (G-Q)}$ beaucoup plus grand que celui du WT tout en gardant la structure moléculaire intacte. Toutefois, il arrive, pour certaines mutations, d'observer du « gating » (Shaker-W434F), mais sans aucun changement de conductance (WT). Ce type de résultats ne permet pas de faire allusion à un découplage puisqu'on ne peut pas quantifier l'énergétique de la conductance ($V_{1/2}$ de la G-V). Un autre critère recherché est la disparition du plateau de probabilité d'ouverture maximal de la G-V pour des voltages qui s'étalent jusqu'à 200 mV.

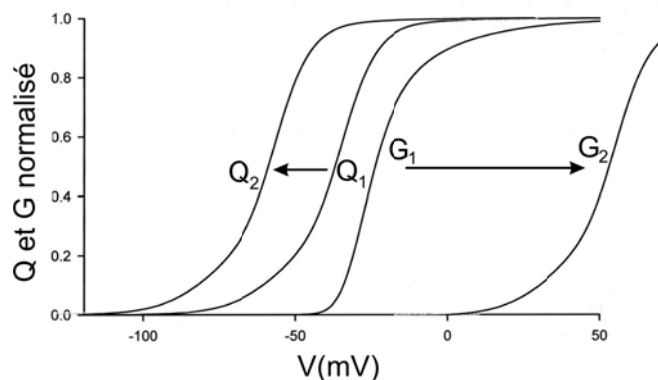


Figure 1.334. Représentation en électrophysiologie du découplage.

Q_1 et G_1 représente le WT et Q_2 et G_2 la structure découplé.

Pour la cinétique, le découplage devrait impliquer des transients de « gating » plus rapide (accélééré), surtout pour le cas du « OFF-gating ». La raison est que le découplage défavoriserait l'état ouvert (faible P_O) et par conséquent la stabilité de l'ouverture et ainsi le OFFSET observé dans le « OFF-gating ». Pourquoi? D'après les modèles présentés dans la section 1.1.1 et la structure cristalline de Kv1.2, l'ouverture du pore est contrôlée par le segment S4. On peut alors insinuer que lors de son activation, ce dernier doit « tirer » vers l'extérieur de la membrane pour écarter le « helical bundle crossing » (Long, 2005a). Si on considère que le couplage est, selon les résultats publiés, dû à l'interaction entre les acides aminés de S4-5L et ceux du C-terminal de S6, la déstabilisation de cette région éliminerait l'interaction et par conséquent le poids du pore sur le mouvement du senseur de voltage (Figure 1.35). Il en découle que cela permettra au senseur de bouger plus librement (Tombola, Pathak *et al.*, 2006; Villalba-Galea, Sandtner *et al.*, 2008) puis se manifestera par un transfert de charge plus rapide. Ce comportement est observé dans la mutation de Ding et Horn (2002 et 2003) et sera utile dans l'analyse des résultats.

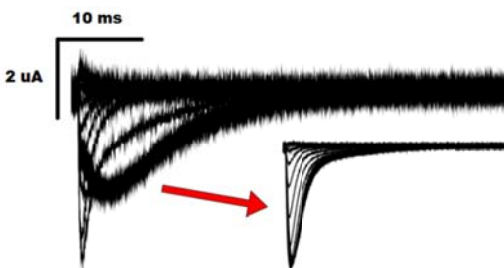


Figure 1.345. La cinétique du « OFF-gating ».

À gauche on observe les WT, et à droite une hypothèse de ce que la cinétique du « gating » ressemblerait lors d'un découplage.

1.4.3. La référence du découplage : Les mutations ILT

Un cas utile pour illustrer le découplage est celui du mutant ILT. L'étude sur une combinaison de mutation conservatrice (V369I, I372L, S376T) du canal Shaker K⁺ (Smith-Maxwell, Ledwell *et al.*, 1998b; Ledwell et Aldrich, 1999) a permis de découpler (partiellement) les deux domaines (Figure 1.36) et d'isoler l'ensemble des micro états impliqués dans la dernière transition avant l'ouverture du pore (Smith-Maxwell, Ledwell *et al.*, 1998a; Ledwell et Aldrich, 1999).

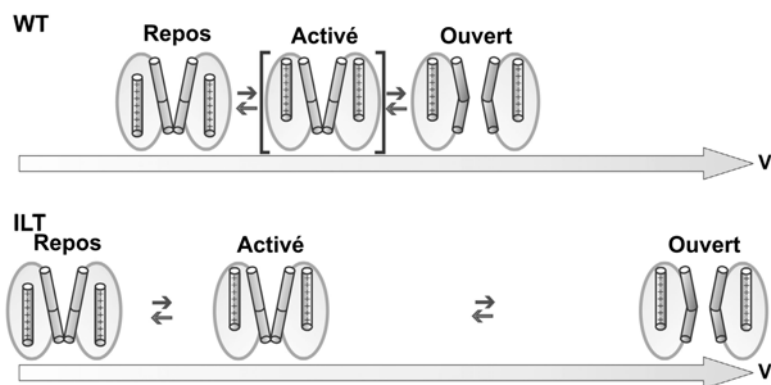


Figure 1.35. Modèle de découplage pour la mutation ILT.

Adapté de (Ledwell et Aldrich, 1999).

Le découplage est observé par le fait que le « gating » s'active à 85 % lors de petite dépolarisation (-60 mV) tandis que les « gates » intracellulaires ne suivent pas immédiatement le mouvement du S4 et requiert une grande dépolarisation pour s'ouvrir complètement et se stabiliser. Ce découplage est illustré par l'énorme décalage entre Q et G en fonction de V (Figure 1.37 gauche). Récemment, la publication du groupe du Dr Bezanilla (Gagnon et Bezanilla, 2010) a démontré qu'une seule sous-unité ILT est suffisante pour affecter grandement le découplage. La dernière transition est dévoilée par les mesures de fluorescence (Figure 1.37 droite) où ils démontrent que cette transition correspond à un transport de 13 % des charges totales responsable de l'ouverture des « gates » au niveau du « helical bundle crossing » (Q₂) (Ledwell et Aldrich, 1999; Webster, Del Camino *et al.*, 2004). De plus, Pathak. (Pathak, Kurtz *et al.*, 2005) a démontré par la méthode de fluorométrie par voltage imposé (Méthodologie), que cette dernière transitions implique un vrai mouvement du segment S4. Il conclut que ce segment avait deux phases distinctes et que durant cette dernière transition les quatre

sous-unités n'opèrent pas indépendamment, mais font partie d'un ensemble de transition coopératif dont l'interaction mutuelle entre différentes sous-unités favorise une interaction stabilisant l'état ouvert (Pathak, Kurtz *et al.*, 2005). Ce deuxième mouvement porte le nom de « gating motion » (Figure 1.37) et associe indirectement le couplage électromécanique à la coopérativité des sous-unités. D'ailleurs, cette idée est appuyée et confirmée par les mutations des positions F401 (Gautam et Tanouye, 1990; Lichtinghagen, Stocker *et al.*, 1990; Kanevsky et Aldrich, 1999) et L382 (McCormack, Tanouye *et al.*, 1991), des résidus qui interagissent directement entre le S4-5L et S5 de deux sous-unités différentes.

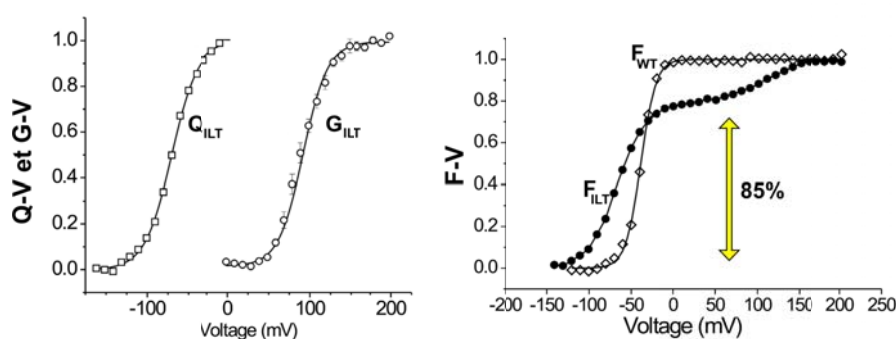


Figure 1.36. Représentation énergétique du découplage de la mutation *ILT*.

Adapté de (Pathak, Kurtz *et al.*, 2005).

Ce dernier résultat appuiera le modèle utilisé dans cette étude. Toutefois, il implique un état de plus dans le diagramme entre l'état actif et l'état ouvert (Figure 1.38. (K_6 et K_{-6})).

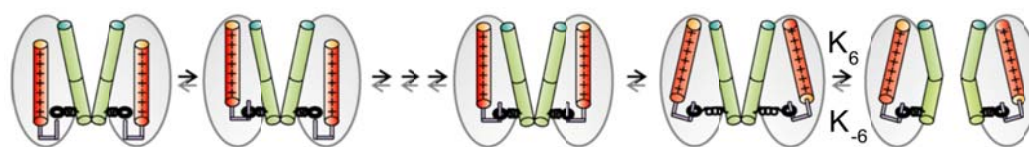


Figure 1.37. Le modèle à 6 états impliquant la coopérativité du mutant *ILT*.

La coopérativité entre sous-unités chez les canaux Kv fut suggérée et mise en évidence durant les années 90. L'étude des comportements cinétiques ainsi que l'analyse des distributions des états énergétiques à l'équilibre (« steady-state ») ont permis de développer des modèles cinétiques pour interpréter et simuler les comportements mesurés en électrophysiologie (Section 1.3). Bien que les modèles existants divergent (mutant, chimère, hétérotétramère) sur plusieurs détails, l'une des seules caractéristiques communes réside dans la nécessité d'une coopérativité pour appuyer les résultats

expérimentaux. Globalement, le modèle de référence est celui de Zagotta (1990) et Schoppa (1992) auquel on réfère à la section 1.3. Ce dernier, implique que les premières transitions, transportant la majorité des charges interagissent indépendamment tandis que la dernière étape, sensiblement moins dépendante au voltage, réagit en coopération.

1.5. Objectifs

Ce mémoire propose une clarification du mécanisme moléculaire responsable du couplage électromécanique chez les canaux Kv de type Shaker K⁺. Le regroupement des deux projets cherche essentiellement à déterminer les étapes séquentielles décrivant le fonctionnement des canaux voltage dépendants. On utilisera simultanément des mesures d'électrophysiologie et de fluorescence (Cha et Bezanilla, 1997) pour approfondir la compréhension du couplage énergétique entre le mouvement de charge du segment S4 (courant de « gating ») et l'ouverture du pore (la conductance). La première étude examinera une interaction moléculaire inter-sous-unitaire (coopérativité) et la deuxième une interaction intra-sous-unitaire (couplage), toutes deux situées dans la région du lien S4-5L (Figure 1.39), reliant les segments transmembranaire S4 et S5.

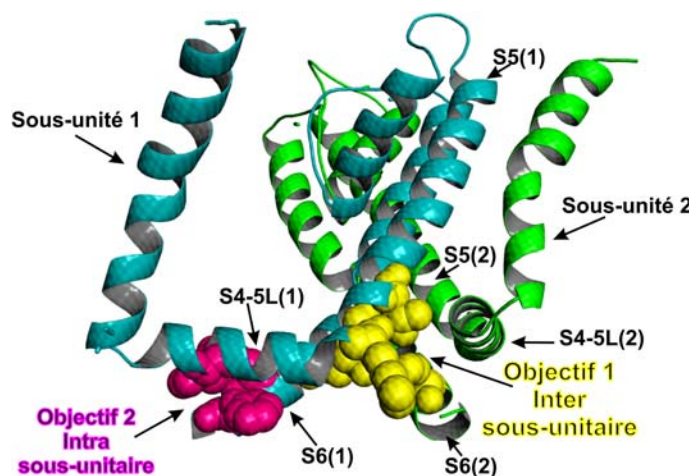


Figure 1.38. Les objectifs.

Les acides aminés en jaune et en rose représentent les positions examinées dans le premier projet et le deuxième projet, respectivement.

1.5.1. Objectif 1 : Coopérativité et asymétrie du courant de « gating »

Dans la section 1.3, on a caractérisé les traits saillants de la cinétique du « gating » pour toutes les différentes amplitudes de dépolarisation. À cet égard, la propriété remarquable est l'asymétrie entre la cinétique du « OFF-gating » et du « ON-gating » (Figure 1.40). Ce ralentissement de cinétique observé dans le « OFF-gating » conduit à l'hypothèse que les transitions initiales dans le modèle d'activation représentent des transitions rapides tandis que les dernières transitions menant à l'ouverture du pore représentent un mouvement coopératif entre toutes les sous-unités du canal (Tagliatalata, Toro *et al.*, 1992; Bezanilla et Stefani, 1994; Loboda et Armstrong, 2001), en assumant que l'ouverture des canaux est coopérative à cause de leur architecture répétitive et pseudosymétrique. Il a été suggéré que cette cinétique asymétrique soit *influencé par la région C-terminal du pore* (« C-type inactivation », (Chen, Steele *et al.*, 1997)) sur la désactivation du « gating » dû à la mutation W434F. Cependant, d'autres croient que ce mécanisme est relié à la *stabilisation de l'état ouvert* due à une certaine interaction entre le pore et le senseur durant l'activation (Kanevsky et Aldrich, 1999).

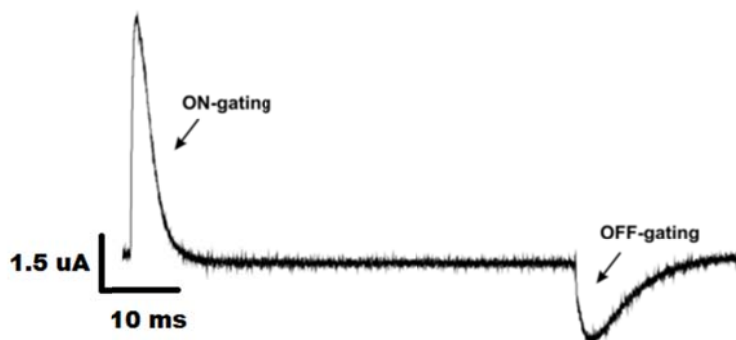


Figure 1.39. Asymétrie entre le « ON- » et « OFF-gating » de Shaker K+.

Pour déterminer si cette cinétique ralentie est influencée par la coopérativité des sous-unités, on examinera une région impliquant le couplage entre les différentes sous-unités (Figure 1.41). On a introduit des mutations dans la région définie par l'interface couplant le segment S4-5L d'une sous-unité et le segment S6 d'une sous-unité adjacente et par l'intermédiaire du courant de « gating », on a vérifié l'influence de cette région par comparaison au type sauvage. On utilisera la méthode de fluorométrie par voltage imposé pour corrélérer le comportement du senseur de voltage dans des conditions où le pore peut conduire les ions.

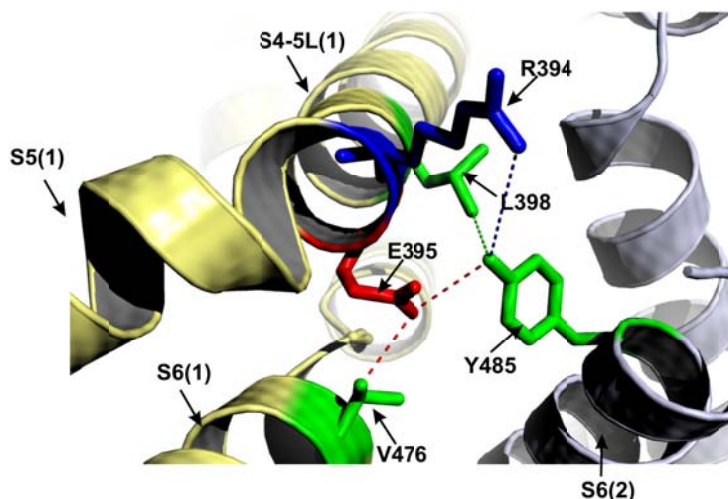


Figure 1.40. Objectif 1 : Visualisation des acides aminés.

Interaction inter-sous-unitaire, vue à partir du milieu intracellulaire.

1.5.2. Objectif 2: Le « Mode Shift »

Lors d'une dépolarisation membranaire, idéalement, la quantité de charges de « gating » transportée (Q_{ON}) doit être égale à la quantité de charges ramenée (Q_{OFF}) lors d'une repolarisation. En effet, aucune charge ne se gagne ni se perd durant ce processus. Toutefois, lorsqu'on prolonge cette dépolarisation, pendant laquelle le pore se retrouve dans l'état ouvert, on observe un déphasage entre les relations $Q-V_{ON}$ et Q_{OFF} ($\Delta V = 7$ mV). Cela implique que le senseur de voltage requiert plus d'énergie (plus grande hyperpolarisation) pour le ramener au repos (position initiale) qu'il en nécessite pour l'activer. De plus, lorsque le système est maintenu à différents potentiels, 0 mV (senseur 100% actif) et -90 mV (senseur 100% fermé), on observe un plus grand décalage dans les $Q-V_{WT(-90 \text{ et } 0 \text{ mV})}$. Cette séparation observée dans les $Q-V$ porte le nom de « Mode Shift » (Figure 1.42). Hypothétiquement, il ne devrait pas exister une différence dans la dépendance du voltage entre les relations Q_{ON} et Q_{OFF} sauf si le canal entre dans un état d'équilibre additionnel par lequel il nécessite plus d'énergie pour revenir (Olcese, Latorre *et al.*, 1997; Olcese, Sigg *et al.*, 2001).

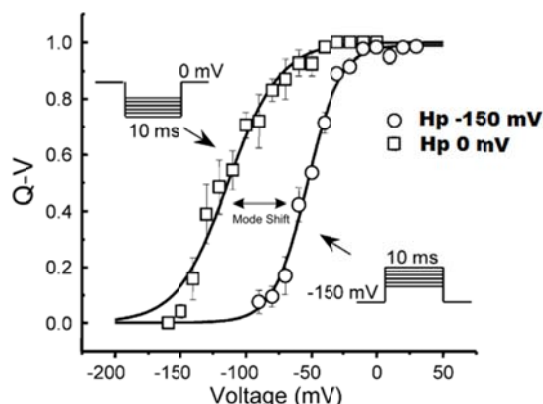


Figure 1.41. Le « Mode Shift ».

La séparation entre QV_{-150} et QV_0 représente le « Mode shift ». On remarque le grand déphasage dans l'illustration. Adapté de (Kuzmenkin, 2004).

Ce « Mode Shift » a déjà été signalé dans les canaux sodique (Bezaniilla, 1982; Kuzmenkin, 2004), calcique (Brum, Stefani *et al.*, 1987; Shirokov, Levis *et al.*, 1992), potassique (Fedida, Bouchard *et al.*, 1996; Olcese, Latorre *et al.*, 1997; Olcese, Sigg *et al.*, 2001; Piper, Varghese *et al.*, 2003) et les HCN (Mannikko, Pandey *et al.*, 2005; Bruening-Wright et Larsson, 2007), cependant, cette caractéristique intrinsèque et son implication dans le rôle physiologique chez les canaux Kv n'est pas encore entièrement compris. Certaines recherches ont insinué que ce mécanisme est relié à l'état du pore (Olcese, Latorre *et al.*, 1997) tandis que d'autres ont démontré qu'il est intrinsèque au senseur de voltage (Villalba-Galea, Sandtner *et al.*, 2008). Alors, pour comprendre ce phénomène, nous débuterons par investiguer l'influence du couplage électromécanique sur le développement du « Mode Shift ». La première étape serait de découpler complètement le pore du senseur. La région la plus propice pour trouver le mécanisme de découplage se trouve entre la région S4-5L et S6 de la même sous-unité (Figure 1.43). L'aromaticité et l'hydrophobicité de cette région sont excellentes pour initier cette étude.

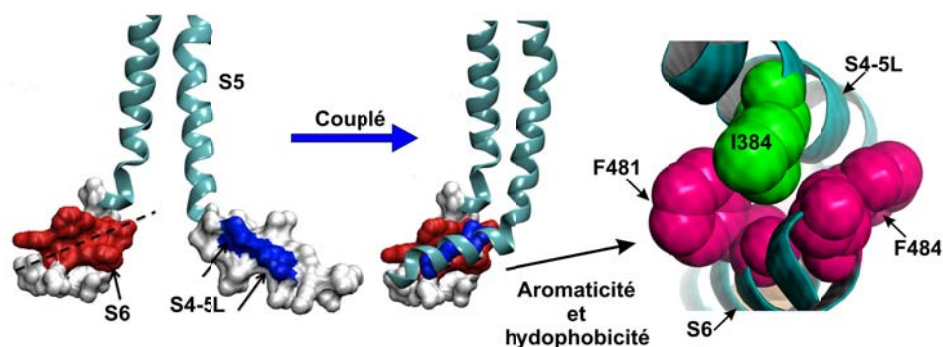


Figure 1.42. Objectif 2 : Visualisation des acides aminés.

Adapté de (Labro, Raes *et al.*, 2008).

2. Méthodologie

2.1. Avant-propos

Plusieurs notions pertinentes à l'expérimentation ne sont pas introduites dans les deux publications jointes à ce mémoire. Alors, pour éliminer le questionnement sur la qualité du travail, le lecteur aura un survol des détails de la méthodologie et de l'instrumentation utilisée dans le cadre de cette étude.

2.2. Biologie Moléculaire et Expression de Shaker K⁺

Le locus de Shaker possède un mécanisme d'épissage qui lui permet d'exprimer différents types de sous-unités (Kamb, Tseng-Crank *et al.*, 1988; Pongs, Kecskemethy *et al.*, 1988; Schwarz et Gu, 1988). Les membres de cette famille sont distingués par leurs différences aux niveaux des domaines amino- et carboxy-terminaux cytoplasmiques. Comme indiqué à la Figure 2.1, le gène Shaker (Sh) K⁺ peut avoir différentes formes. D'ailleurs, plusieurs études en électrophysiologie et en biologie moléculaire ont démontré que des variations dans les régions N- et C-terminales affectent énormément la cinétique d'activation ou d'inactivation des courants potassiques obtenue lors d'une expression dans un système ovocytaire (Iverson, Tanouye *et al.*, 1988; Timpe, Jan *et al.*, 1988; Timpe, Schwarz *et al.*, 1988). Plusieurs grandes familles ont été classifiées dans lesquelles on retrouve Sh-A-B-C-D. Parmi ces dernières, on identifie Sh-A par son

inactivation 100 fois plus rapide que celle observé par Sh-B et, aussi, Sh-D s'inactivant après 1 seconde et reconnue pour favoriser la rectification sortante.

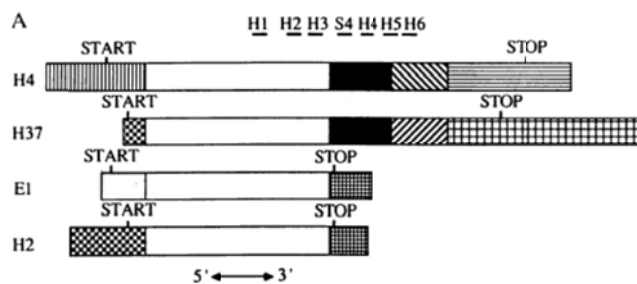


Figure 2.1. Exemple de Shaker K+. Diversité d'exons.

Adapté de (Kamb, Iverson *et al.*, 1987).

Ainsi, la diversité du gène Shaker K⁺ est identifiée par les différentes séquences terminales rattachées à une séquence centrale (tronc) hautement conservée (Figure 2.1 blanc). (Zagotta, Germeraad *et al.*, 1989; Zagotta et Aldrich, 1990). Les H inscrit à gauche de la figure 2.1 représentent les exons couplé au tronc. Les exons du tronc sont numérotés de 7 à 12 et de 14 à 15. Les exons 16 et 18 définissent le C-terminal (inactivation lente) et ceux du N-terminal sont représenté telle que suit : l'exon 4 génère Sh-A ; l'exon 1, Sh-B2 ; l'exon 3, Sh-C2 et l'exon 2 Sh-D2 (Figure 2.1).

Dans le cadre de notre étude, on utilise le Shaker Sh-A dérivé de l'ADNc H4 (exon 4) (Iverson, Tanouye *et al.*, 1988; Pongs, Kecskemethy *et al.*, 1988; Timpe, Jan *et al.*, 1988). La raison qui sous-tend cette utilisation provient de la variété mutationnelle qu'on y a déjà introduite. Sachant que Sh-A s'inactive, des études sur cette variante ont été faites pour déterminer la partie de la structure NH₂-terminal responsable dans l'inactivation rapide. Par essai et erreur, les groupes de recherche de Hoshi et Aldrich ont déterminé qu'une délétion des acides nucléiques 6 à 46 ($\Delta 6-46$) (Hoshi, Zagotta *et al.*, 1990; Zagotta, Hoshi *et al.*, 1990) éliminait complètement l'inactivation. De là, ils ont ouvert la voie à un travail sur la conductance et la possibilité d'étudier le canal en état stationnaire (« steady state analysis ») dans un processus nommé « inactivation removed » (IR). En outre, pour amplifier l'expression du gène, les régions 5' et 3' non transcrites ont été éliminées et une séquence Kozak (z) fut introduite (Kozak, 1991). La nomenclature du type sauvage IR utilisé est Shaker(Sh)zH4-IR. Ce dernier a été sous-cloné dans le vecteur pBSTA dans le laboratoire de Dr. Enrico Stefani.

2.2.1. Ovocytes

Les ovocytes de *Xenopus leavis* sont largement utilisés comme système d'expression pour les canaux ioniques. Pour les obtenir, une grenouille est submergée dans une solution de tricaine 1.2g/L pendant 10 minutes. Après l'anesthésie, elle est placée sur le dos, ventre vers le haut, sur un plat réfrigéré à 0°C. Une incision perforant la peau et le muscle abdominal de 2 cm est faite sur un côté de l'abdomen. Selon la quantité voulue, le tissu ovarien est retiré avec une paire de pince et placé dans une solution de Barth. Les ovocytes sont examinés sous le microscope à dissection pour s'assurer de leur qualité. Pour des œufs de bonne qualité (environ 1mm de diamètre) (Stage V-VI), le contraste entre la pigmentation de l'hémisphère animal (noir) et l'hémisphère végétal (Blanc) devrait être franc. En plus, leur forme devrait être ronde.

Les sacs folliculaires sont ensuite sectionnés en petits morceaux, rincés avec une solution de SOS (« Standard Oocyte Solution ») libre de Ca²⁺ (102 mM NaCl, 3mM KCl, 1mM MgCl₂, 5 mM Hepes ; pH 7.2) et placés dans une solution de collagénase (1mg/ml). Cette dernière dégrade la membrane folliculaire protégeant la matrice cellulaire. Durant le traitement, les œufs sont brassés doucement pendant 30 ± 5 minutes pour ensuite être lavés quatre fois avec la solution de SOS libre de Ca²⁺, afin d'inhiber l'activité enzymatique résiduelle. Lorsque le traitement est fini les ovocytes sont triés et incubés à 18°C pendant une heure avant de pouvoir injecter l'ARNm. La solution d'incubation (Barth) doit être changée quotidiennement pour que les ovocytes se conservent plusieurs jours.

Lors de l'injection d'ARNm, les pipettes utilisées sont étirées avec le « Flaming/Brown Micropipette puller » Modèle P-97 (Laboratoire de Rémy Sauvé). La pipette est remplie d'huile minérale avec une seringue où toute bulle d'air est évacuée. Elle est jumelée à l'injecteur pour ensuite la remplir (0.5 ul) méticuleusement d'ARNm. Chaque ovocyte est injecté de 50 nl avec une concentration variant entre 0.05 – 1.0 µg/µl. Après l'injection, les œufs sont incubés pendant 1 jour à 18°C (ou 2 jours à 12°C + 4 heures à la température de la pièce) pour une expression optimale.

2.3. Électrophysiologie et Fluorescence.

Afin d'observer un changement de conformation durant l'activation d'une protéine membranaire et d'établir une corrélation avec sa fonction physiologique, on utilise la spectroscopie de fluorescence simultanément avec des mesures d'électrophysiologie. Essentiellement, on mesure le changement de fluorescence provenant de la surface d'un ovocyte clampé et surexprimé de Shaker K⁺. Cette approche repose sur les variations d'intensité émise par des sondes fluorescentes, incorporées de façons covalentes, résultant d'une perturbation du microenvironnement au cours de l'ouverture du canal. Les étapes nécessaires pour la recombinaison de ces deux techniques sont décrites dans les paragraphes suivants.

2.3.1. Fluorescence

Dans l'introduction, nous avons mentionné que le mécanisme d'ouverture est contrôlé par le positionnement du segment S4. Ce dernier est distribué entre deux états globaux, et notamment, lorsqu'il se dépolarise, sa région orienté vers le côté extracellulaire se déplace d'un environnement hydrophobique (couche hydrophobique) vers la crevasse extracellulaire hydrophilique. De ces propriétés découle une excellente opportunité pour développer une application fluorescente utilisant le « quenching » environnemental. En effet, nous cherchons à détecter des changements de conformation spécifique pour une région localisée telle que la région extracellulaire de S4. Alors, on requiert une méthode qui nous permettra de marquer efficacement qu'une seule position désirée par un fluorophore. On utilise le marquage dirigé par l'intermédiaire de la mutagenèse pour remplacer l'acide aminé d'une position désiré par une cystéine. Par la suite, il est primordial de vérifier si la protéine est encore fonctionnelle. Aussi, il est souvent question de vérifier la population de cystéine à la surface protéique avant un marquage. La présence de plusieurs cystéines pour des régions accessibles au fluorophore rendrait le marquage non spécifique et introduira des artefacts qui pourraient nuire à la qualité des résultats obtenue. Alors, pour le cas d'une protéine membranaire exprimée dans des ovocytes, on recherche une position exposée au côté extracellulaire de la bicouche telle que les liens S3-4L et S1-2L (Figure 2.2) (Cha et Bezanilla, 1998). De plus, il ne faut pas

oublier que les sondes fluorescentes ont des propriétés moléculaires polaires et ne peuvent traverser la barrière phospholipidique. Autrement dit, il n'est pas nécessaire d'éliminer les cystéines exposées du côté interne lors du marquage.

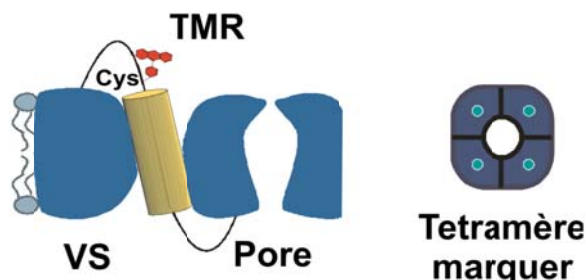


Figure 2. 2. Positionnement du fluorophore.

La réaction chimique liant le fluorophore à la cystéine est gérée par un groupement fonctionnel de types « maleimide » ou « methanethiosulfonate » (MTS). Ces derniers sont rattachés au fluorophore (Figure 2.3) et, en présence du groupement sulfure (SH) de la cystéine, engendrent une réaction de type sulfhydryle (SH-C) qui par conséquent forme une liaison covalente (irréversible) où un lien disulfure (réversible), respectivement. Ce dernier est réversible par un agent réducteur tel que le dithiothreitol (DTT) (Berliner, 1983).

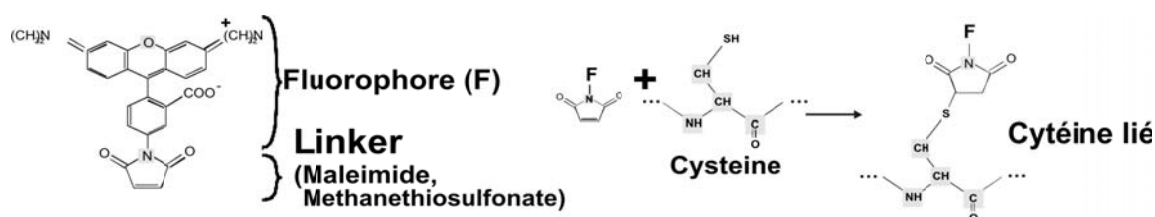


Figure 2.3. Liaison « maleimide » et MTS.

Dans cette étude, on utilise le tétraméthylrhodamine (TMR) comme sonde fluorescente. Une sonde de TMR détient une très grande photostabilité, de plus sa taille est idéale pour ce type d'expérimentation, elle est imperméable à la membrane et son «quantum yield» varie fortement en fonction de l'environnement (Cha et Bezanilla, 1997;1998; Cha, Zerangue *et al.*, 1998; Blunck, Starace *et al.*, 2004). Ces propriétés saillantes font en sorte que le TMR est un candidat idéal pour notre recherche. Maintenant, avant d'introduire le protocole méthodologique, pour ceux qui désirent utiliser ce protocole, il

est toujours important de considérer la taille du fluorophore en question. Il a été démontré que le poids du fluorophore peut fortement affecter le comportement du canal (Cha et Bezanilla, 1998).

2.3.1.1. Protocole de marquage

Les ovocytes sont initialement injectés d'ARNm incluant la mutation A359C (disons, Shaker(Sh)-zH4-IR-W434F-A359C) et incubés « overnight » pour avoir une expression complète. Les ovocytes sont par la suite placés dans une solution de marquage (5 ml) (115 mM K^+ -MES, 10 mM HEPES, and 2 mM Ca^{2+} -MES₂, pH 7.0) où l'on incorpore 5 μ l de TMRM à 50 mM dissous dans du Diméthylesulfoxyde (DMSO) (Figure 2.4). La solution de marquage dépolarise la membrane et permet au fluorophore d'accéder plus facilement à la cystéine, cela rend le marquage plus efficace. Après 30 minutes d'incubation, les ovocytes sont lavés 2 à 3 fois dans une solution de Barth pour être finalement prêts pour l'expérimentation. Pour obtenir un $\Delta F/F$ maximal, il est toujours utile d'éliminer les cystéines endogènes retrouvées à la surface d'un ovocyte. Un traitement d'une heure par 1 mM de N-ethylmaleimide (NEM) dans une solution ionique avant l'expression est suffisante.

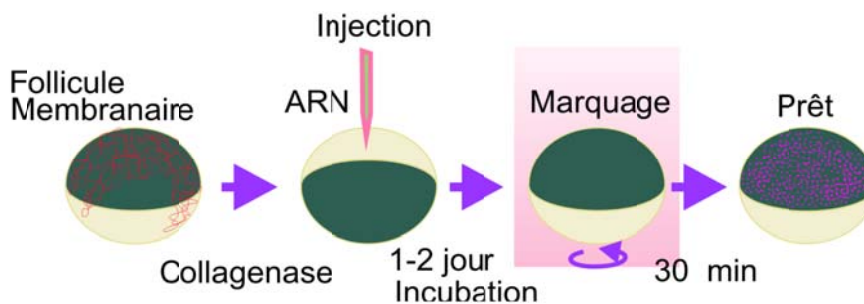


Figure 2.4. Injection et marquage d'ovocyte.

2.3.2. « Cut-Open Voltage Clamp » (COVC)

Pour étudier les propriétés reliées au couplage entre le senseur de voltage et le pore on utilise une méthode d'électrophysiologie par voltage imposé spécifiquement mis au point pour résoudre le mieux possible la cinétique des courants fonctionnels et transitoires décrits dans la section 1. Cette technique porte le nom du « Cut-Open Voltage Clamp » et a été développée en collaboration par Dr Francisco Bezanilla et Dr.

Enrico Stefani, reconnu comme des pionniers dans le domaine de la biophysique membranaire. Ce qui suit met en contexte le pourquoi de cette méthode.

Dans l'introduction on a expliqué que l'évolution temporelle des courants de « gating » est essentiellement importante pour déterminer la cinétique entre différents états fermés. Celle-ci est limitée par le mouvement de charge confiné à la bicouche lipidique. D'ailleurs, dépendamment de la quantité de charges transportée par le canal, le courant de « gating » peut être accéléré (beaucoup de charge, grande amplitude) ou ralenti (moins de charges, petite amplitude). À cet égard, si la transition est trop vite, comme dans le cas de Shaker K⁺, le courant de « gating » partage les mêmes propriétés temporelles que le courant capacitif. Par conséquent, les deux signaux deviennent confondu et difficile à séparer. Alors, comment éliminer cette décharge capacitive pour résoudre les transitions rapides de Shaker K⁺?

La réponse du courant capacitif au voltage détermine la vitesse du clamp. Alors, pour étudier des mouvements d'événement rapide il faut trouver une méthode qui permet de bien résoudre la décharge du courant capacitif. De plus, il est expliqué que pour les méthodes du TEV (Annexe 2), la résistance de série est la cause primaire dans l'erreur du potentiel membranaire. Sachant que le chargement dans la capacitance membranaire est une fonction de la résistance membranaire ainsi que de la résistance en série. Il est clair que la constante de temps associé au changement de voltage est proportionnelle à la résistance de série.

$$\tau_{charge} \propto R_{S+A} \quad (2.1)$$

Ainsi plus la résistance de série sera grande, plus lents seront le chargement et le déchargement de la membrane et moins bonne sera la résolution du « clamp ». Autrement dit, la réponse au voltage ne suivra pas assez bien le pulse de commande. Donc, évidemment, pour résoudre la décharge capacitive il faut diminuer la résistance de série. Alors, il est hors de doute que la méthode TEV mentionnée dans l'annexe n'est pas apte à résoudre des signaux aussi rapides que ceux de Shaker K⁺. De plus, on mesure des inhomogénéités de voltage à travers la surface « clampée » due à l'ampleur de la surface de l'œuf et de la résistance du cytosol.

Afin d'éliminer ces problèmes, dans le COVC, l'ovocyte est stratégiquement perméabilisé et le courant est directement injecté à l'intérieur de l'œuf en diminuant la résistance d'accès. Toutefois, la résistance du cytosol est encore présente (minimale). C'est pour cela que l'ovocyte est séparé en trois compartiments électriquement indépendants (Figure 2.5) et seul le compartiment supérieur, isolé, est objet d'étude. Maintenant que la section membranaire à l'étude est beaucoup plus petite que celle mesurée en TEV mais assez grande pour avoir des courants macroscopiques bien résolus avec un bon rapport signal sur bruit (SNR), et que le courant soit injecté directement dans l'ovocyte sans aucune résistance, les problèmes de « space clamping » et de la résolution capacitive sont grandement diminués et on obtient ainsi une nette amélioration sur le contrôle total du voltage (pas d'erreur et 10 fois plus rapide).

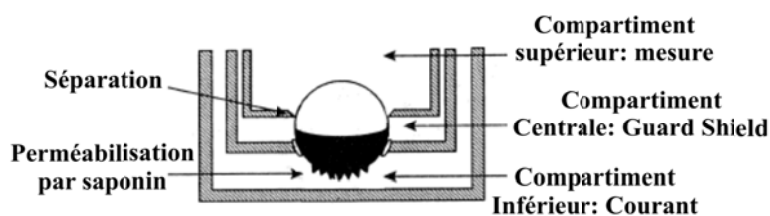


Figure 2.5. Schéma du Cut-Open Voltage Clamp.

Voici, un résumé des avantages principaux de cette méthode :

- 1) Une excellente réponse pour les hautes fréquences ($\tau_{\text{charge}} \sim 42 \text{ us}$) et un faible bruit de fond (1.2 nA rms pour 5kHz) lors de l'enregistrement. Cela permet de décrire précisément les courants de « gating ». De plus, on peut clampé adéquatement des courants ioniques de 10 à 20 μA .
- 2) Des conditions d'enregistrement stable pendant 3 heures.

2.3.2.1. Le montage du COVC

La procédure du COVC est basée sur la partition d'un ovocyte en trois chambres de plexiglas (Figure 2.5). La chambre supérieure (1) ainsi que la chambre centrale (2) sont constituées d'un diamètre d'ouverture de 700 μm . La chambre inférieure (3) est utilisée pour accéder à l'intérieur de l'ovocyte qui est maintenu à un potentiel virtuel de 0 mV (masse). Les chambres 2 et 3 sont toutes les deux « clampé » au même voltage de commande, toutefois avec un circuit par voltage imposé différent (Figure 2.6). Chaque

clamp est maintenu par une paire d'électrodes spécifique à la chambre même ((2) GS1 & GS2 et (1) P1 & P2). Le courant membranaire est enregistré seulement du compartiment supérieur (1). Ce dernier est isolé de la chambre 3 par le « Guard Shield » (GS) du compartiment centrale. Le GS minimise le courant de fuite et empêche la circulation du courant entre la chambre centrale et externe. Le clamp observé ($I(V_2)-V_1$) se mesure entre la masse virtuelle de l'ovocyte et le bain externe.

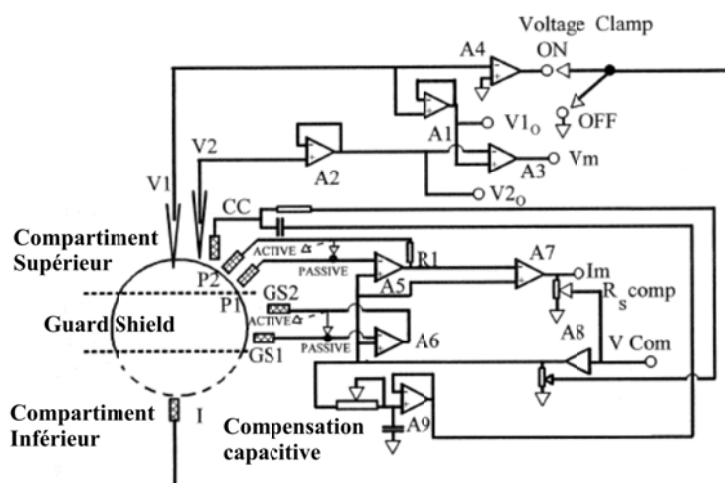


Figure 2.6. Montage du « Cut-Open Voltage Clamp » : Circuit électrique

2.3.2.2. Procédure expérimentale

Au début de chaque expérience, le compartiment supérieur est soulevé et un ovocyte défolliculé est centré sur le trou du deuxième compartiment. La première chambre est remplacée pour former un compartiment final de trois sections. Une fois que l'ovocyte est installé, on rajoute une solution externe spécifique pour le type de mesure voulu (115 mm *N*-methyl-d-glucamine, 10 mm HEPES, 2 mm $\text{Ca}(\text{OH})_2$, pH 7.2) dans les trois chambres. Le courant est injecté du compartiment interne (I) et le courant mesuré est celui du compartiment externe. Chaque compartiment est relié au circuit électrique par l'intermédiaire de ponts d'agar. Ces ponts rejoignent chacun un puits différent submergeant des électrodes non polarisables de type Ag|AgCl dans 1M de NaCl.

À ce stade, le courant capacitif est détectable lors de pulses dépolarisants de 20 mV (HP : 0 mV). Pour perméabiliser l'ovocyte, on échange la solution externe du troisième compartiment avec une solution interne (pour les mesure de courant de « gating »):115

mm *N*-methyl-d-glucamine, 10 mm HEPES, 2 mm EDTA ; ou courant ionique : 115 mm KOH, 10 mm HEPES, 2 mm EDTA) contenant 0.02% de saponine. Pour contrôler l'ampleur de la perméabilisation, on observe l'amplification du courant de fuite (fuite linéaire). Après 30 secondes de réaction, on échange de nouveau la solution du troisième compartiment par une solution interne jusqu'à ce qu'on ait atteint une stabilité dans le courant. L'ovocyte est finalement accessible et la résistance d'accès est éliminée. À ce stade, on peut clamber l'ovocyte et prendre des mesures de courant ionique ou de « gating ». Les courants sont visualisés et enregistrés par le logiciel d'acquisition GPatch fourni par le département d'Anesthésiologie, UCLA.

Spécifiquement pour les mesures de courant de « gating », après avoir clamped l'ovocyte, le courant capacitif peut être éliminé par la compensation linéaire. Un courant transient est injecté dans la polarité opposée au courant capacitif par l'électrode CC située dans la chambre 1. La compensation a trois constantes de temps indépendantes dont chacune est reliée à une amplitude. Pour le cas de Shaker K⁺ (W434F) de type sauvage, lors d'une surexpression, le courant de « gating » est tellement grand qu'il peut être facilement observable sans compensation.

Pour le cas où on introduit une mutation dans la molécule, il se peut que la densité d'expression soit grandement diminuée. Dans ce cas, la compensation linéaire n'est pas suffisante et on requiert la soustraction capacitive. En effet, souvent, pour séparer le courant de « gating » du courant capacitif, on utilise les propriétés non-linéaires du « gating » en fonction du voltage. Cette non-linéarité est illustrée à la figure 1.29 où on voit très clairement que pour des valeurs de potentiel supérieures à 0 mV et inférieures à -90 mV le mouvement de charge est nul (ou presque). Ainsi, le déplacement de la quantité de charge Q totale est restreint à des voltages de valeurs spécifiques. Par contre, le changement de la capacité membranaire est insaturable puisqu'il est proportionnel au voltage de commande. Autrement dit, un « pulse » positif ou négatif de même amplitude produit des courants capacitifs similaires avec des polarités différentes, indépendamment du potentiel de maintien. À cet effet, l'addition de deux courants opposés donne un courant nul. Alors si le potentiel de maintien est à l'extérieur des voltages où le « gating » ne se manifeste pas, l'élimination de ce dernier reflètera le mouvement de

charges de « gating » pour une certaine dépolarisation P . Ce protocole s'appelle le « P procédure ». Pour le cas où les dépolarisations sont trop grande, on somme des « pulses » de soustraction plus petits tel que $(P/4) \times 4$, cette procédure se nomme P/4 (Bezanilla et Armstrong, 1977) et s'illustre comme suit :

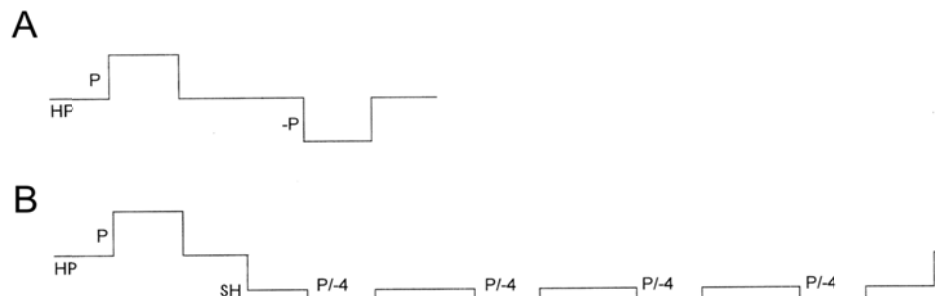


Figure 2.7. Protocole de soustraction.

2.3.2.3. La qualité du clamp en COVC

La vitesse du clamp varie beaucoup avec la profondeur de la pénétration de l'électrode V1. Dans les conditions où la profondeur de pénétration est optimale, la résolution du courant capacitif est de 25 μs au centre du dôme et 35 sur les bords. Toutefois une insertion approfondie de 50 μm augmente le τ_{charge} jusqu'à 90 μs . Cependant, l'intégrale du courant capacitif reste constante. Cela est causé par le développement d'une résistance en série qui se distribue entre le bout de la microélectrode V1 et la face interne du dôme. La résistance effective peut être mesurée en divisant la constante de temps par la capacité. Ceci correspond à une augmentation de la résistance de série effective de 0.8 $\text{K}\Omega$ à 3.1 $\text{K}\Omega$. Donc, cette résistance dépend grandement de la profondeur de l'électrode. Et c'est l'une des raisons principale pour laquelle on peut observer des variations dans la constante de temps entre deux ovocytes lorsqu'on mesure le « gating ». Alors pour avoir la meilleure résolution temporelle de manière répétitive, V1 doit être méticuleusement insérée de manière à ce que le bout soit le plus proche possible de la membrane interne.

2.4. « Cut-Open Voltage Clamp Fluorescence »

Le montage expérimental du « Cut-Open Voltage Clamp Fluorescence » (COVCF) (Figure 2.11) permet de mesurer le courant de « gating » et le courant ionique simultanément au signal de fluorescence en fonction du voltage. La figure suivante (2.8) illustre une expérience représentative pour la construction de Shaker(Sh)zH4-IR-W434F-A359C. La sonde de TMR est liée à la cystéine en position 359 et un protocole de « pulse » entre -120 et 30 mV est appliqué à l'ovocyte.

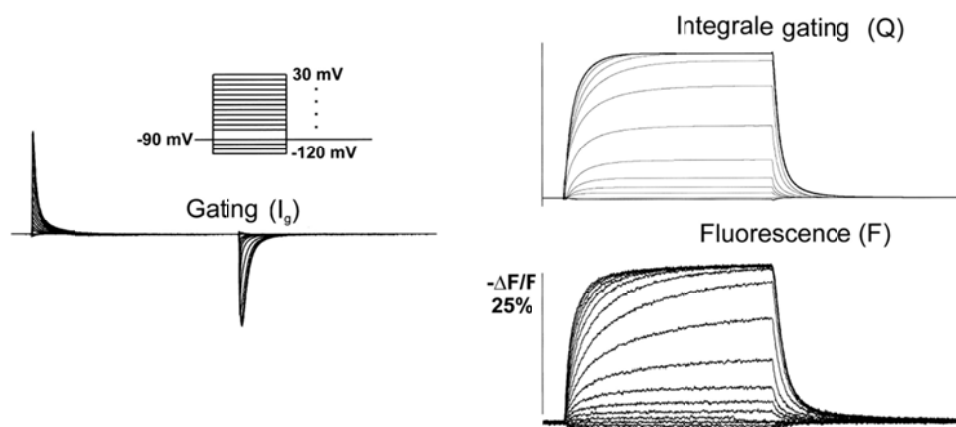


Figure 2.8. Résultats expérimentaux du COVCF.

Adapté de (Bezanilla, 2000).

Ce résultat démontre que la dépendance au voltage de la fluorescence (F-V) corrèle très bien avec le déplacement de charge totale (Q-V) lors d'un enregistrement concomitant (Figure 2.9). Il va de même pour les positions M356 et A365 (Mannuzzu, Moronne *et al.*, 1996). En plus, lorsque la mutation A359C est avec le type sauvage conducteur, on observe le même décalage énergétique entre les relations F-V et G-V que celui entre Q-V et G-V (Figure 1.29). Dans ces conditions, on peut étudier le comportement du senseur de voltage sans se questionner sur la possibilité des effets secondaires que W434F peut introduire lors d'une mutation putative. Puisqu'on ne peut pas mesurer Q-V et G-V simultanément, dans ces conditions, F-V représente l'énergétique de Q-V tandis que G-V caractérise encore l'état ouvert.

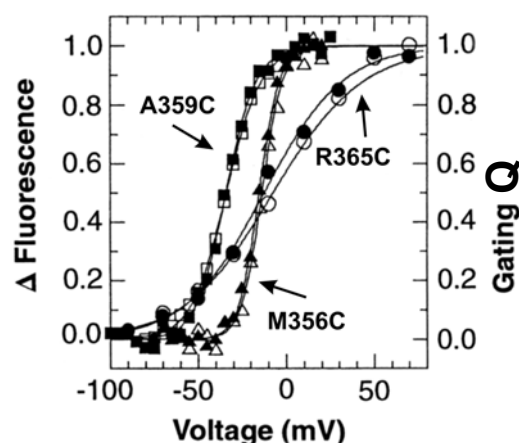


Figure 2.9. *F-V vs Q-V.*

Adapté de (Mannuzzu, Moronne *et al.*, 1996).

La Figure 2.8 nous dévoile une seconde propriété que l'expérimentateur peut utiliser : l'évolution temporelle de F. Théoriquement, si le marquage de chaque segment S4 est d'un ratio de marquage 1:1 et que Q et F sont des variables restreintes à deux extrémum (position/intensité initiale et finale), on peut insinuer que le changement dans la fluorescence (F) devrait suivre la même évolution temporelle que celle du « gating » (Q) et même avec une très bonne résolution puisque les fluorophores ont un temps de vie très court (ns). En effet, les constantes de temps d'atténuation (le τ des traces de fluorescence en fonction du temps lors de la dépolarisation et de la repolarisation de la membrane) concordent, toutefois, il existe des différences substantielles (Cha et Bezanilla, 1997;1998; Bezanilla, 2000) (Figure 2.10). Malgré le fait qu'il ne se présente aucun constante de temps de F corrélant avec la constante de temps rapide de Q, l'interpolation des courbes temporelles avec deux exponentielles démontre que la constante de temps lente est identique à la constante de temps majeur de F (Figure 2.10b). Cela signifie que la fluorescence mesuré montre des changements d'environnement non observable dans les courant de « gating » et qui corresponde à une composante particulière qui se rajoute au déplacement des charges Q (Figure 2.10a). D'autant plus, il est à considérer qu'il n'y a aucune raison intrinsèque pourquoi les deux cinétiques devraient être parfaitement identiques. Ainsi, il convient de préciser que ces deux types de mesures donnent différentes indications sur le changement de l'environnement de S4 même s'ils mesurent le même changement de conformation de manière très différente sans oublier qu'ils corrént en fonction du voltage.

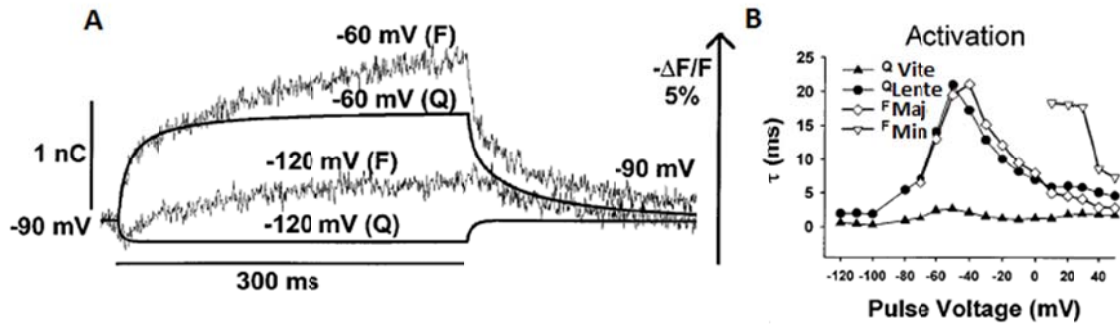


Figure 2.10. Évolution temporelle de Q Vs F (cinétique)

Adapté de (Bezaniilla, 2000).

Il en découle que la fluorescence est l'équivalent du mouvement de charge dans un modèle de deux états puisqu'il ne représente pas vraiment un changement de conformation mais qu'un observable illustrant les états globale du canal. Alors, les signaux de fluorescence dans le COVCF sont mesurés comme des changements d'intensité normalisés. Lorsqu'on obtient l'intensité maximale émise de la surface (F_1), en tenant compte du marquage non spécifique (F_B), on lance le protocole de « pulse » et on mesure l'intensité atténuée (F_2) par le « quenching » (dF/F) (Figure 2.8 en bas). Pour chaque pulse, dF est interprété comme suit,

$$\frac{dF}{F} = \frac{F_1 - F_2}{F_1 + F_B} \quad (2.2)$$

Où F_1 et F_2 représente les deux niveaux de fluorescence macroscopique pour chaque « pulse », maximal et atténué (minimal), respectivement. dF représente la différence de fluorescence. Lorsque la protéine change de conformation, le signal de fluorescence change exponentiellement (section 1.6), suivant la probabilité de transition d'un état à un autre (Markov Model). La transition entre ces états se définit comme suit

$$A(t) = A(0) \exp(-kt) \quad (2.3)$$

$$B(t) = B(0) + A(0)(1 - \exp(-kt)) \quad (2.4)$$

Où A (maximal) et B (atténué) représentent les différents états et k le taux de transition. La fluorescence totale est équivalente au taux d'occupation multiplié par la fluorescence respective de chaque valeur de F .

$$F(t) = F_1(A(t)) + F_2(B(t)) \quad (2.5)$$

$$F(t) = F_2(A(0) + B(0)) + (F_1 - F_2)A(0)\exp(-kt) \quad (2.6)$$

Donc à l'aide d'un fit mono-exponentiel on peut obtenir le taux de transition entre l'état A et B .

2.4.1. Montage expérimentale de l'épifluorescence

Dans la configuration du montage expérimental (Figure 2.11), l'optique épifluorescente partage le même chemin lumineux lors de l'excitation et de l'émission fluorescente. Les différentes longueurs d'ondes sont discriminées par un miroir dichroïque qui réfléchit la lumière d'excitation et transmet la fluorescence. Le montage est retenu sur un microscope droit (Axioscope 2 FS upright ; Zeiss) et ce dernier est constitué d'un objectif couplant la fluorescence émise de la surface de l'ovocyte à un système de détection.

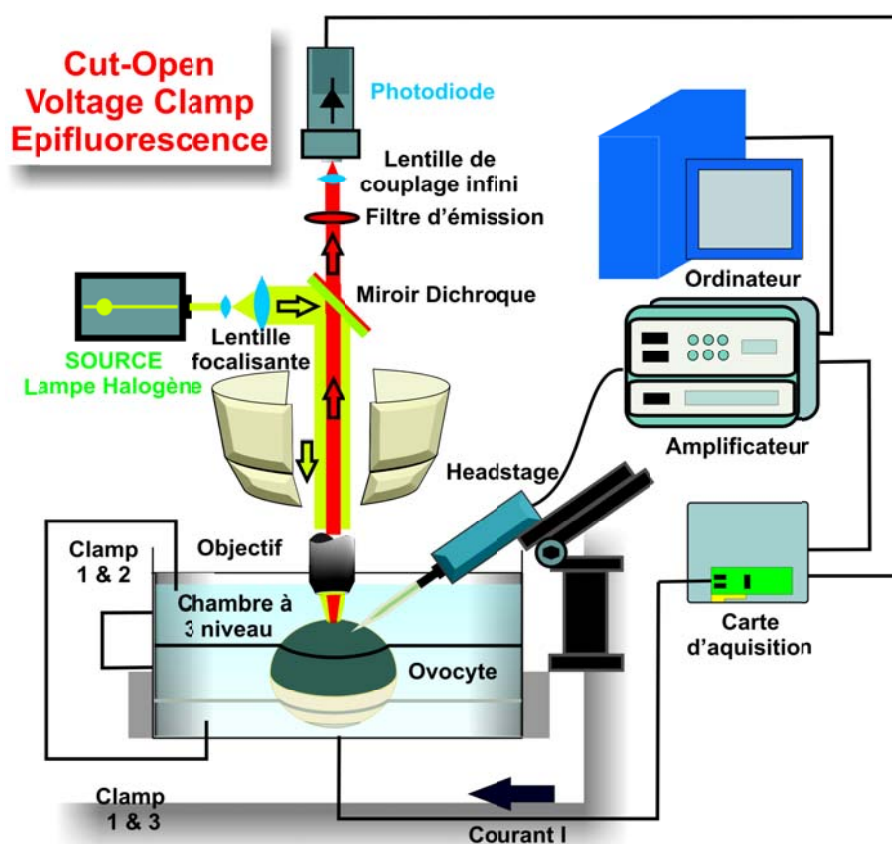


Figure 2.11. Montage du Cut-Open Voltage Clamp Fluorescence COVCF

Initialement, le clamp de l'ovocyte marqué est contrôlé par le système de Cut-Open (CA-1B, Dagan corporation ; Minneapolis). Lorsque l'ensemble est prêt, un objectif (20X) à immersion d'une ouverture numérique de 0.8 est submergé dans la solution externe et focalisé sur la surface du dôme situé dans la chambre supérieure. Par la suite, la source d'excitation provient d'une lampe halogène à intensité variable (Hal 100/ SNT 12V). Dépendamment du fluorophore utilisé (TMR), les longueurs d'onde d'excitation

sont choisies par un filtre à bande passante (excitation: 532/30 nm), pour ensuite être réfléchies sur un dichroïque (545DCLP/Chroma Technology) et traverse l'objectif d'immersion pour rejoindre la surface de l'ovocyte. Sur le chemin de retour, la fluorescence se transmet par l'objectif, traverse le dichroïque et est filtrée selon les longueurs d'onde désirées par un filtre d'émission (595 nm). La lumière est finalement focalisée par un ensemble de lentilles sur la surface active d'une photodiode (Photomax 201PN qui est à son tour reliée à un amplificateur très sensible (Photomax 200, Dagan corporation).

Par ailleurs, l'isolation de la surface externe de l'ovocyte permet de mesurer la fluorescence effective émanant seulement de cette surface clampée. Cette fluorescence effective peut être améliorée par 3 facteurs. Premièrement, il est important que l'objectif d'immersion soit muni d'une grande ouverture numérique. Elle agrandit le champ de vision et permet de récolter un plus grand nombre de photon d'émission. Deuxièmement, il est nécessaire de positionner l'ovocyte tel que ce soit le pôle animal qui soit excité. Les propriétés de pigmentation de ce côté absorbent grandement la lumière et empêchent l'auto-fluorescence membranaire d'intervenir dans les mesures de fluorescence. Troisièmement, le couplage entre l'objectif et la paire de lentilles focalisant l'émission de fluorescence sur la surface active de la photodiode doit être optimale pour la simple raison que le photo-courant mesuré par l'amplificateur est proportionnel à la quantité de lumière absorbée par la surface active. Si le focus est trop large dû au couplage optique, l'intensité effective sera sous-estimée. Aggrandir la surface de mesure peut sembler la solution à ce problème, mais au contraire, une telle approche augmentera le bruit et la capacitance associée au signal et diminuera dF/F . En effet, plus la surface active est petite, plus le signal sera clair. Donc, avec un système optique corrigé à l'« infini » jumelé à une petite surface active, on obtient les meilleurs résultats possibles. En plus, la conversion d'un photon en un photo-courant nécessite un amplificateur à faible bruit (ex : Patch Clamp) et ainsi, le choix de photodiode et d'amplificateur est décisif pour la qualité du dF/F recherché. Dans notre cas, l'amplificateur Photomax 200 est aussi sensible que l'axopatch 200b utilisé pour les mesures de « patch clamp ».

3. Résultats

Cette section comporte essentiellement deux communications : Batulan, Haddad et Blunck 2010 ; et Haddad et Blunck 2011, dans des journaux avec comité de lecture. Leurs conclusions ne décrivent qu'une partie des travaux réalisés durant le cheminement de cette maîtrise. Pour les résultats restants, ils ont été omis, étant donné que le travail entourant le troisième projet n'a pas été complété. Ce dernier travail décortique temporellement l'enchaînement des interactions principales dans le couplage électromécanique. Il faut aussi mentionner que ma contribution s'échelonne aussi dans le développement d'un quatrième projet. Ce dernier est présentement en marche et permet de mesurer la diffusion rotationnelle de segment peptidique par les mesures de l'atténuation d'anisotropie de fluorescence en temps résolue (TCSPC) « Time correlated single photon counting ».

Le premier papier a été publié dans le « Journal of Biological Chemistry », volume 285, numéro 18, page 14005-14019, le 30 avril 2010. Cette publication a été soumise par trois contributeurs et avec un apport scientifique équitablement réparti entre Zarah Batulan et Georges Anthony Haddad. Le directeur du projet, Dr. Rikard Blunck fut le rédacteur principal de l'article, des réponses aux évaluations, de la lettre de soumission à l'éditeur et des simulations de modèle cinétique. Ma contribution consiste à avoir participé à la partie expérimentale, à l'analyse des données et à leur interprétation. J'ai aussi contribué à la formation de la post-doctorante Zarah Batulan pour la procédure d'expérimentation « Cut-Open Voltage Clamp ». Son expérience et surtout sa rigueur académique ont par la suite facilité la réussite de ce projet. Plus spécifiquement, les mutants avec lesquels l'auteur du mémoire a travaillé sont les suivants : Y485A-(H)-(C)-W434F et -A359C, E395A-W434F et A359C, L398A-(L)-(W)-(V)-(N)-W434F, V476A-W434F. De plus, ma contribution a permis d'améliorer le rendement du système d'acquisition en minimisant le bruit de fond et en optimisant le programme de protocole de pulse. Finalement, mon expérience avec le COVCF a contribué au développement d'une nouvelle chambre de compartimentation beaucoup plus efficace. Le deuxième article a été publié dans le « Journal of General Physiology », volume 137, numéro 5, le 25 avril 2011. Je suis l'auteur principal étant donné ma contribution prédominante.

3.1. Article 1

An Intersubunit Interaction between S4-S5 Linker and S6 Is Responsible for the Slow Off-gating Component in Shaker K⁺ Channels

Zarah Batulan¹, Georges A. Haddad² and Rikard Blunck²

¹Supported by a Groupe d'Étude des Protéines Membranaires scholarship.

²Département de Physique and Groupe d'Étude des Protéines Membranaires (GÉPROM), Université de Montréal, Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada

3.1.1. Abstract

Voltage-gated ion channels are controlled by the membrane potential, which is sensed by peripheral, positively charged voltage sensors. The movement of the charged residues in the voltage sensor may be detected as gating currents. In Shaker K⁺ channels, the gating currents are asymmetric; although the on-gating currents are fast, the off-gating currents contain a slow component. This slow component is caused by a stabilization of the activated state of the voltage sensor and has been suggested to be linked to ion permeation or C-type inactivation. The molecular determinants responsible for the stabilization, however, remain unknown. Here, we identified an interaction between Arg-394, Glu-395, and Leu-398 on the C termini of the S4-S5 linker and Tyr-485 on the S6 of the neighboring subunit, which is responsible for the development of the slow off-gating component. Mutation of residues involved in this intersubunit interaction modulated the strength of the associated interaction. Impairment of the interaction still led to pore opening but did not exhibit slow gating kinetics. Development of this interaction occurs under physiological ion conduction and is correlated with pore opening. We, thus, suggest that the above residues stabilize the channel in the open state.

3.1.2. Introduction

The voltage dependence of ion channels is the basis for all electrical signaling in the central nervous system. In tetrameric voltage-gated K^+ channels, each subunit is composed of six transmembrane α -helices (S1–S6), with S1–S4 forming the voltage sensing domain and S5–S6 of all four subunits forming the pore. The voltage-sensing domains are covalently connected to the S5 of the pore region by the S4-S5 linker. The intracellular gate is made up of the S6 C-terminal ends that cross each other, forming a bundle that occludes the pore when the channel is closed. Pore opening in voltage-gated K^+ channels is controlled by the movement of the voltage sensor in which charged residues of the S4 respond to changes in membrane potential. During this conformational change, the charges are moved through the electric field, generating the transient gating currents (for review, see Ref. (Bezanilla 2008)). Gating currents were first predicted by Hodgkin and Huxley and were first detected in sodium channels by Armstrong *et al.* (Armstrong, Bezanilla *et al.* 1973; Bezanilla and Armstrong 1974). The movement is transferred to the pore domain (electromechanical coupling) and subsequently leads to pore opening. Voltage sensor movement precedes pore opening so that the transitions the channel undergoes during electromechanical coupling are reflected in the gating currents.

Activation (on) and deactivation (off) gating currents for the non-conducting Shaker-IR channel, W434F (Hoshi, Zagotta *et al.* 1990; Zagotta and Aldrich 1990; Perozo, MacKinnon *et al.* 1993) have been previously described (Perozo, MacKinnon *et al.* 1993; Bezanilla, Perozo *et al.* 1994; Stefani, Toro *et al.* 1994). Briefly, on-gating currents rise and decay quickly after small depolarizations but rise more slowly and exhibit more prolonged and complex decay kinetics after intermediate depolarizations and, finally, develop and decay rapidly after depolarizations large enough to activate all channels. In contrast, off-gating currents, which develop upon repolarization, exhibit the following salient features; (i) after partial activation from low depolarizations (*e.g.* pulsing up to -50 mV), currents are fast, representing backward transitions that return channels from partially activated back to resting states, (ii) after intermediate depolarizations (*e.g.* pulsing to between -40 and -30 mV) currents show a similar fast component seen at low depolarizations followed by a slow component, the latter

indicating slow deactivation of a small number of fully activated channels, (iii) after high depolarizations (*e.g.* pulses >-30 mV), currents have a rising phase and slow decay, signifying the slow return from the fully activated state of all channels (see Fig. 2). The slow off-gating currents have been described early on (Hoshi, Zagotta *et al.* 1990; Zagotta and Aldrich 1990; Perozo, MacKinnon *et al.* 1993). These characteristics of the off-gating currents have led others to suggest that the early transitions in the activation sequence represent quickly reversible events within one subunit, whereas the late transitions preceding the full activation of channels are slowly reversible and likely represent a concerted step involving all subunits (Zagotta and Aldrich 1990; Tagliatela, Toro *et al.* 1992; Loboda and Armstrong 2001). The slow off-gating component has also been proposed to be dependent on the permeant ion (Perozo, MacKinnon *et al.* 1993; Chen, Steele *et al.* 1997; Varga, Rayner *et al.* 2002) and was thought to be linked to C-type inactivation (Chen, Steele *et al.* 1997). Other authors, however, view it rather as a stabilization of the open state (Kanevsky and Aldrich 1999). Although theoretical descriptions of off-gating currents have been proposed (McCormack, Joiner *et al.* 1994; Zagotta, Hoshi *et al.* 1994; Sigg, Qian *et al.* 1999), the correlating structural determinants underlying these patterns remain unclear.

Several mutants of the Shaker K⁺ channel have been described previously to suppress the slow off-gating component (Schoppa and Sigworth 1998; Kanevsky and Aldrich 1999; Hackos, Chang *et al.* 2002; Soler-Llavina, Chang *et al.* 2006). In most cases, pore opening did not occur in the experimental range, confirming that the slow component is linked to pore opening (Perozo, MacKinnon *et al.* 1993; McCormack, Joiner *et al.* 1994). This had first been demonstrated by preventing development of the slow component by application of 4-aminopyridine, which keeps the pore in the closed conformation (McCormack, Joiner *et al.* 1994; Armstrong and Loboda 2001; Loboda and Armstrong 2001; del Camino 2005; Pathak, Kurtz *et al.* 2005). However, in other mutations, the slow component was diminished despite an open pore. The mutations were located in the C-terminal S6 (see “Discussion”).

All of the voltage sensors of the Shaker K⁺ channel are thought to enter the activated state before the channel undergoes one final cooperative step that leads to pore opening (Zagotta, Hoshi *et al.* 1994; Ledwell and Aldrich 1999; Pathak 2004). It has been

suggested that the slow off-component is related to the final concerted step of the four voltage sensors (Tagliatela, Toro *et al.* 1992; Bezanilla, Perozo *et al.* 1994; Stefani, Toro *et al.* 1994). This gave us a hint where the responsible residues are to be found. Electromechanical coupling between voltage sensor movement and pore opening is mediated by interaction between the S4-S5 linker and the C-terminal S6 (Slesinger, Jan *et al.* 1993; Chen, Mitcheson *et al.* 2001; Lu, Klem *et al.* 2001; Lu, Klem *et al.* 2002; Tristani-Firouzi, Chen *et al.* 2002; Ding and Horn 2003; Decher, Chen *et al.* 2004; Long 2005; Labro, Raes *et al.* 2008). Because the final opening transition is thought to be a cooperative step (Tytgat and Hess 1992; Bezanilla, Perozo *et al.* 1994; Zagotta, Hoshi *et al.* 1994; Schoppa and Sigworth 1998), we looked for an interaction that couples together neighboring subunits of the tetrameric channels.

In this study we have mutated several conserved residues located at the interface between the S4-S5 linker and S6 of adjacent subunits to determine via analysis of the off-gating currents how interactions between these two regions influence electromechanical coupling and, in particular, whether the slow off-gating component is influenced. We have identified several key residues located at the C-terminal end of the S4-S5 linker and of the S6 whose interactions contribute to the rising phase and slow decay of the off-gating currents. We propose that interactions between these residues represent the last transition(s) in the activation pathway.

3.1.3. Experimental procedures

3.1.3.1. Molecular Biology and Channel Expression

All experiments were done using the pBSTA vector into which the Shaker IR (“inactivation-removed,” containing an N-terminal deletion ($\Delta 6-46$) that removes its fast inactivation properties (Hoshi, Zagotta *et al.* 1990; Zagotta, Hoshi *et al.* 1990)) was cloned. Point mutations were introduced using site-directed mutagenesis (QuikChange; Stratagene). Sequences were verified using automated DNA sequencing. cDNAs were linearized and *in vitro* transcribed using T7 RNA polymerase (T7 mMessage machine kit; Ambion). cRNAs (23 or 46 μ l; 0.1~1.0 μ g/ μ l) were injected into *Xenopus* oocytes, and currents were recorded 2–5 days after injection.

3.1.3.2. Electrophysiology and Fluorescence Measurements

With the cut-open voltage clamp epifluorescence technique using an Axioskop 2 FS upright microscope (Zeiss), CA-1B High Performance Oocyte Clamp (Dagan Corp.), and Photomax 200 Photodiode Detection System (Dagan Corp.) currents and fluorescence were measured as described previously (Cha and Bezanilla 1997). Before recording, oocytes were placed in a 3-compartment chamber containing an external solution (115 mM *N*-methyl-d-glucamine, 10 mM HEPES, 2 mM Ca(OH)₂) adjusted to pH 7.1 using MES,³ then permeabilized by exchanging external solution in the bottom chamber with 0.2% saponin. After permeabilization, saponin solution was replaced with an internal solution (10 mM HEPES, 2 mM EDTA, 115 mM *N*-methyl-d-glucamine (for gating current recording) or KOH (for ionic current recording)) adjusted to pH 7.1 using MES. The voltage electrode was filled with 3 M KCl. Recordings were done at room temperature.

Gating currents were recorded from oocytes expressing mutations introduced into a non-conducting (W434F) Shaker IR-pBSTA vector background. The relation between the gating charge (Q) as a function of voltage (V) was fit into a single Boltzmann equation,

$$\frac{Q}{Q_{max}} = \frac{1}{1 + \exp\left(-\frac{zF}{RT}(V - V_{1/2})\right)} = \frac{1}{1 + \exp(-(V - V_{1/2})/dV)} \quad (3.1)$$

Here, Q/Q_{max} is the normalized charge obtained from integrating the on-or off-gating currents, z is the valence, F is Faraday's constant, $V_{1/2}$ is the voltage at which 50% of the maximal gating charge has moved from one state to the other, R is the gas constant, T is the temperature, and $dV = RT/zF$.

Ionic currents were recorded in oocytes expressing mutations made in a conducting Shaker IR-pBSTA background, which has a cysteine substitution in the extracellular space above the S4 (A359C or M356C). Tagging these cysteines with a fluorophore (tetramethylrhodamine-5-maleimide; Invitrogen) enables the tracking of the movement of the S4 voltage sensor (Mannuzzu, Moronne *et al.* 1996; Cha and Bezanilla 1997) while simultaneously recording ionic current. For fluorescence experiments, oocytes were first labeled with 5 μ M tetramethylrhodamine-5-maleimide dissolved in a solution containing 115 mM K⁺-MES, 10 mM HEPES, and 2 mM Ca²⁺-MES₂, pH 7.0, for 20

min at room temperature in the dark and washed twice in supplemented Barth solution before recording. For ionic current recordings, the steady state currents elicited from a series of depolarizations was used to calculate conductance (G) of each mutant channel. GV relations were also fit into a single Boltzmann equation,

$$\frac{G}{G_{max}} = \frac{1}{1 + \exp\left(-\frac{zF}{RT}(V - V_{1/2})\right)} = \frac{1}{1 + \exp(-(V - V_{1/2})/dV)} \quad (3.2)$$

where G/G_{max} is the normalized conductance, and $V_{1/2}$ is the voltage at which 50% of the maximal conductance has been reached.

Double Boltzmann distributions were fitted to

$$\frac{G}{G_{max}} = \frac{1}{1 + \exp\left(-\frac{zF}{RT}(V - V'_{1/2})\right) \cdot \left(1 + \exp\left(-\frac{zF}{RT}(V - V_{1/2})\right)\right)} = \frac{1}{1 + \exp\left(-\frac{V - V'_{1/2}}{dV'}\right) \cdot \left(1 + \exp\left(-\frac{V - V_{1/2}}{dV}\right)\right)} \quad (3.3)$$

according to a three-state sequential model closed \leftrightarrow activated(closed) \leftrightarrow open with equilibrium at $V'_{1/2}$ and $V_{1/2}$ for the first and second transition, respectively. This follows after short derivation from Equation 4 below with voltage-dependent rate constants. It should be noted that this is not a superposition or multiplication of two single Boltzmann distributions.

For experiments evaluating the effect of 4-aminopyridine (4-AP) on-gating and ionic currents, the final molarities of the carrier ion (N -methyl- d -glucamine for gating and K^+ for ionic current) in internal solutions were adjusted to compensate for 10 mM 4-AP. After initial recording of currents in response to a series of increasing depolarizations, the channels were incubated with 10 mM 4-AP, and currents were repetitively acquired after the same saturating depolarizing pulse. Once 4-AP no longer had an effect on gating or ionic currents, currents were recorded in response to another series of depolarizations. Data acquisition and analysis programs were developed at the University of California, Los Angeles (Dept. of Anesthesiology).

3.1.3.3. Molecular Modeling

Energy minimization of Kv1.2 (PDB 2A79) S4-S6 domains (for wild type and mutant E327A (E395A in Shaker)) was conducted using Discover 3 forcefield and visualized with INSIGHT II software. Spherical areas of 8 Å from residue 327 in each subunit were subjected to forcefield conditions in a water box, whereas the rest of the molecule remained fixed.

3.1.3.4. Kinetic Modeling

We created a 5-state model (see Fig. 9B) and fitted it to the gating currents obtained from a series of depolarizing pulses using Matlab. The first two transitions were charge-carrying transitions with a ratio of 0.45 ($C \leftrightarrow A_1$) to 0.55 ($A_1 \leftrightarrow A_2$) of the total charge. The subsequent two transitions were electro-neutral. We chose the model to describe the initial movement of the voltage sensor itself ($C \rightarrow A_2$) and the subsequent interactions developing during electromechanical coupling between voltage sensor and pore ($A_2 \rightarrow A_5$). We, thereby, abided by the paradigms that the on-rate constants were free to vary for all pulse voltages, whereas the off-rate constants were constant because they all occur at the same resting potential during deactivation. The initial conditions for the on-gating transition (start of the pulse) are given by the steady state of the rate constants at resting potential (off-rate constants), and for the off-gating transition the predicted values after the depolarizing pulse according to the on-rate constants were used. With this model the traces could be well fitted except for possible delays in the immediate onset of on-gating, which require additional steps in the charge movement. We, however, were interested in the transitions occurring after major charge movement.

In principle, rate constants should follow an exponential voltage dependence. However, we did not fit all voltages simultaneously and did, thus, not enforce the exponential voltage dependence. Therefore, transitions with low occupancy at a certain voltage range compensated for other transitions.

3.1.3.5. Steady State of a Sequential Model

One can derive from steady state probabilities that, in a sequential model $A_1 \leftrightarrow A_2 \leftrightarrow A_3 \dots A_{n-1} \leftrightarrow A_n$ with forward rate constants $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3, \dots, \alpha_{n-1}$ and the backward rates $\beta_1, \beta_2, \beta_3, \dots, \beta_{n-1}$, the equilibrium occupancy of A_1 is given by

$$A_1(t \rightarrow \infty) = \frac{1}{1 + \frac{\alpha_1}{\beta_1} \left(1 + \frac{\alpha_2}{\beta_2} \left(1 + \frac{\alpha_3}{\beta_3} \dots \left(1 + \frac{\alpha_{n-1}}{\beta_{n-1}} \dots \right) \right) \right)} \quad (3.4)$$

Assuming $A_1 \leftrightarrow A_2$ is the charge carrying transition (or lumping all major charge carrying transitions into $A_1 \leftrightarrow A_2$), the normalized charge equals $Q/Q_{\max} = 1 - A_1$. This means that, if $\beta_i \gg \alpha_i$, all subsequent transitions $j > i$ have only a minor influence on A_1 . Also, the further apart from A_1 a transition is, the less it will influence the position of the QV .

It also follows immediately that $A_1 < \beta_1/(\alpha_1 + \beta_1)$ because the term in each of the parentheses is always larger than or equal to 1. This means that at $V/2$ of the first transition ($\alpha_1 = \beta_1$), $Q > 1/2$. Thus, the $V/2$ of the entire system will always be more negative than that of the charge carrying step(s), and the QV will always be shifted to more negative potentials.

3.1.4. Results

Using the crystal structure of the mammalian homolog of Shaker, Kv1.2 (Long 2005), as a template, we identified several amino acids whose side chains project out into the intersubunit space between the S4-S5 linker and S6 of adjacent subunits. In the presumed open, inactivated state of the Kv1.2 crystal structure, Tyr-485 at the C-terminal end of the S6 of subunit IV appears to interact with several residues on the neighboring subunit I (Fig. 1A). The closest contacts were with Arg-394 and Glu-395 on the S4-S5 linker of subunit I, whereas more distant contacts were with Val-476 on the S6 of subunit I and Leu-398 located on the N-terminal S5 of subunit I (Fig. 1A). To determine the importance of these residues for electromechanical coupling, we verified whether they were well conserved in different K_V channels. We aligned sequences spanning S4-S5 linker, N-terminal S5, and S6 regions in various related K^+ channels,

including voltage-gated mammalian and *Drosophila* K⁺ channels, a voltage-gated bacterial K⁺ channel (KvAP), and a cyclic nucleotide-regulated bacterial ion channel (MlotiK). The most conserved residues were Glu-395 (10/12) and Tyr-485 (11/12), with the latter found even in the distantly related MlotiK. The basic amino acid Arg-394 was conserved in the Shaker/Kv1 family and both bacterial channels, KvAP and MlotiK. In the other channels, it was replaced by another basic residue, lysine, in Shab and Shaw and by an amide, asparagine, in the mammalian homologs for Shab and Shaw. Val-476 and Leu-398 were conserved in 8 and 9 of 12 sequences, respectively. The fact that Arg-394, Glu-395, Leu-398, Val-476, and Tyr-485 are well conserved suggests their importance in proper channel function.

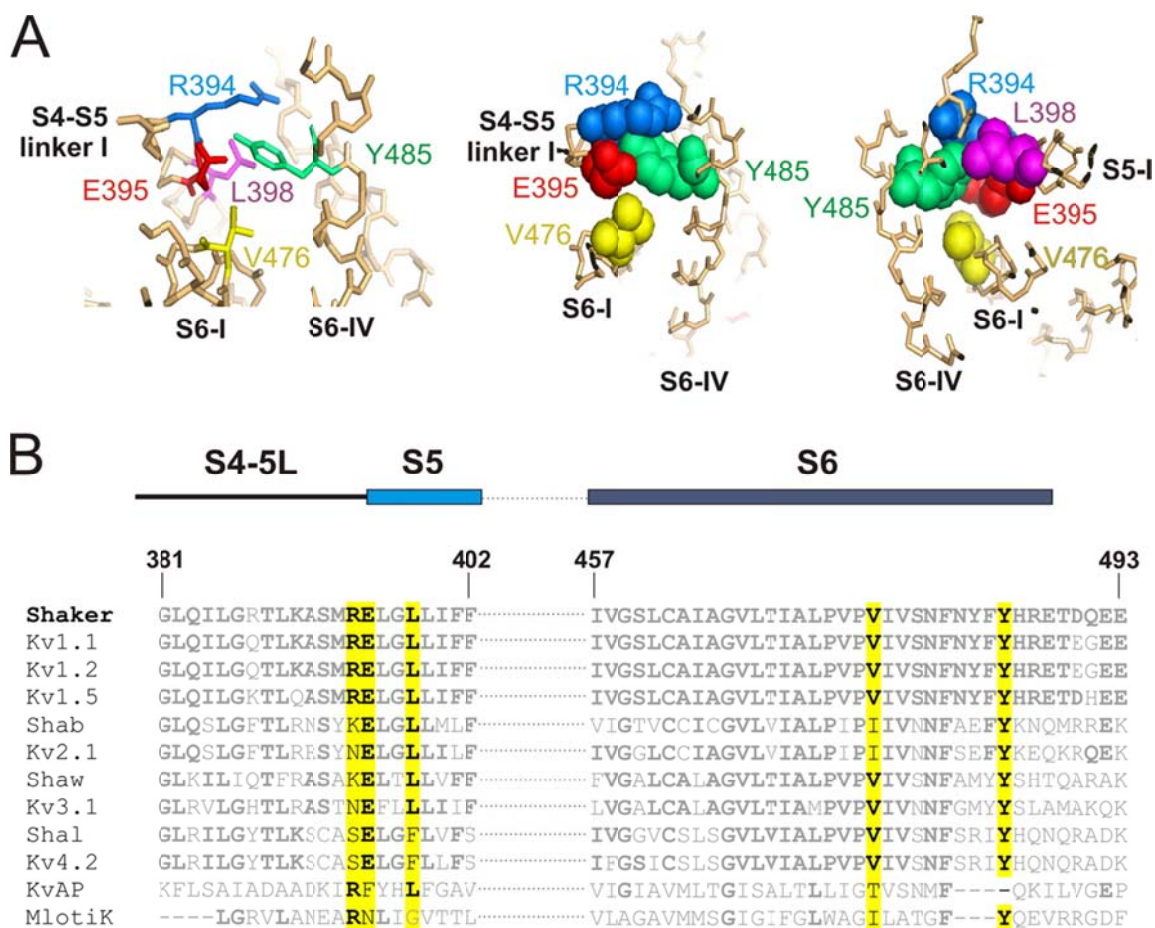


Figure 3.1.1. Candidate interactions among residues on the S4-S5 linker and S6 of adjacent subunits in Shaker K⁺ channels.

A, shown are side chains of the candidate amino acids (numbered as in Shaker) shown in *stick* (left) and *space-filling* (middle, right) representation in the Kv1.2 crystal structure (Long 2005). The S4-S5 linker and S6 of one subunit (I) and the S6 C terminus of the adjacent subunit (IV) are shown. The *right-most* image shows the same region as the other structures except it is rotated by ~180°. B, alignment of

sequences spanning the S4-S5 linker, N-terminal S5, and S6 of *Drosophila* (*Shaker*, *Shab*, *Shaw*, *Shal*), mammalian (*Kv*), and bacterial (*KvAP*, *MLotiK*) potassium channels. Using *Shaker* as a template, amino acids commonly conserved in the other channels are in *bold*, and residues involved in an S4-S5 linker/S6 interaction, shown in *A*, are highlighted in *yellow*.

3.1.4.1. Mutations in Residues at the S4-S5 Linker/S6 Interface Affect Features of the Gating Current

We characterized the variation of gating current kinetics by several mutations in each of the positions identified above. Mutations were introduced into the non-conducting *Shaker-IR* channel, W434F (Hoshi, Zagotta *et al.* 1990; Zagotta and Aldrich 1990; Perozo, MacKinnon *et al.* 1993). We mutated each residue to alanine but also studied more conservative mutations (R394Q, E395D, L398V, L398I, L398N, Y485F, Y485H) and charge reversal mutations (R394E, E395R) (Table III.I.I). All mutants expressed functionally, except Y485F and L398A. We initially studied the effect of each mutation on voltage sensor movement by analyzing gating currents produced in response to membrane depolarization (Fig. 2). Variations were found in both the on- and off-gating currents. The on-gating currents were accelerated only in E395R, L398V, L398W, and Y485A, whereas they remained unchanged for all other mutants. The effects on off-gating currents were more pronounced, which may be due to the fact that during deactivation the channels have to traverse the later steps of electromechanical coupling before charge movement because these transitions occur between closing of the pore and movement of the voltage sensor to its resting position. Analysis of the off-gating currents will provide information on these late transitions, and thus, we concentrated on the off-gating currents in this manuscript.

The mutants can be classified into three groups on the basis of their effects on the off-gating currents (Fig. 2). The first is a group of mutants that completely removed the slow onset and slow decay kinetics typically seen in W434F when returning from high depolarizations (see the Introduction) and showed almost symmetrical gating currents (E395D, L398V, L398I (data not shown), Y485A, Y485H). These mutants form an interaction stabilizing the activated (or open) state of the channel. As this interaction acts across subunits, it very likely has some implication in cooperative opening of the

channel. The second group of mutants modified, *i.e.* slowed down (E395R), immobilized (E395A, V476A), or accelerated (R394A, L398W), the slow components of the off-gating currents and thereby modulated the underlying interaction, which indicates that the corresponding residues are part of or located in close proximity to the molecular determinants of the interaction. Different mutations of position Glu-395 and Leu-398 are represented in both the first and second groups, confirming that these two positions play a central role in the stabilization process. Mutations of the third group did not significantly alter the shape of the gating currents (L398N, R394Q, R394E (data not shown)).

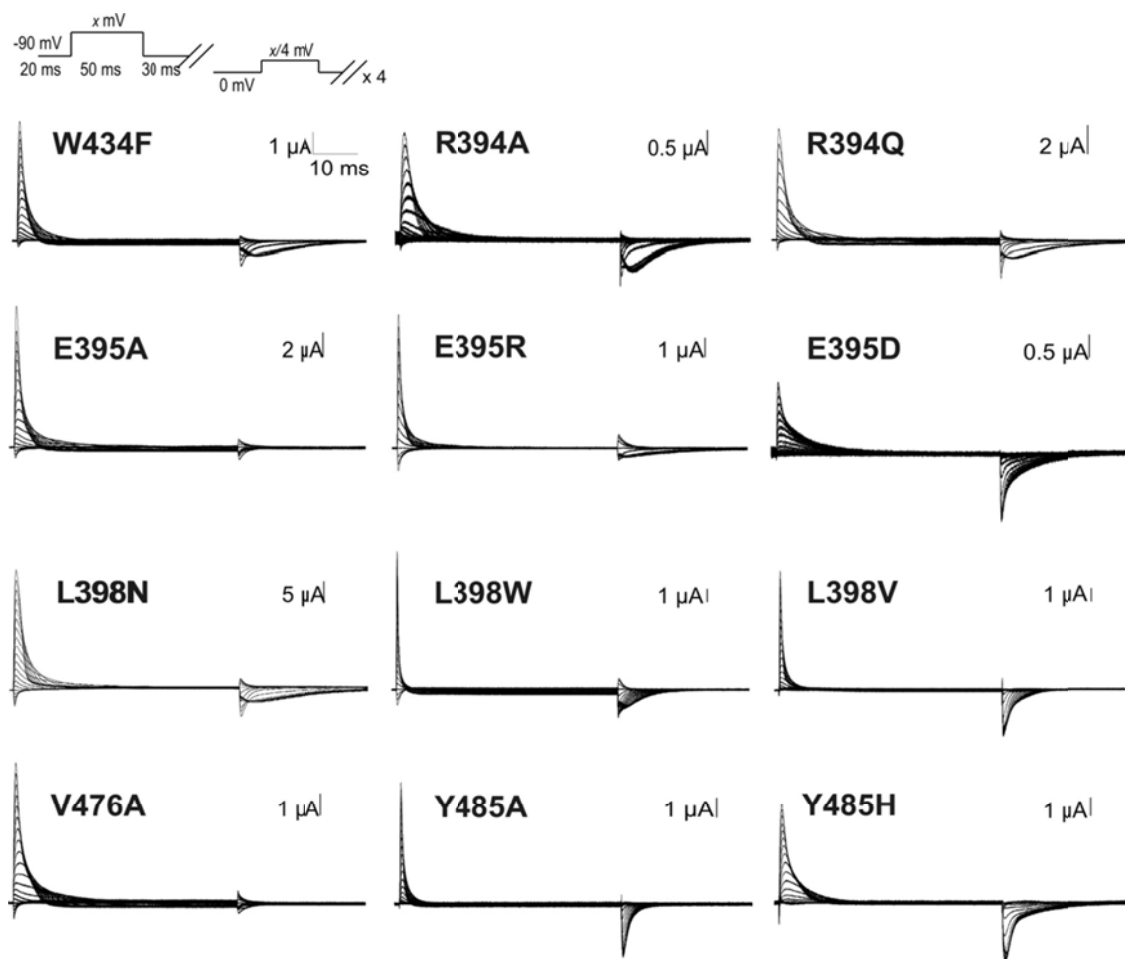


Figure 3.1.2. Gating current profiles in Shaker mutants.

Gating current traces representative of each mutation are shown after subtraction of capacitive currents using a P/4 protocol. Cut-open oocytes expressing W434F (control) or the various mutants were held at -90 mV, and depolarizations were made in 10-mV increments up to +60 to +100 mV.

Shaker construct	I_{gating}						n
	Q_{ON}			Q_{OFF}			
	$V_{1/2}$	dV	$\Delta V_{1/2}$	$V_{1/2}$	dV	$\Delta V_{1/2}$	
W434F	-45.9	± 0.8	8.7 ± 0.7				
R394A	-32.5 ± 0.7	6.3 ± 0.6	+13.4	-40.2 ± 0.5	-53.2 ± 0.7	8.0 ± 0.6	5
R394Q	-47.9 ± 1.3	8.4 ± 1.1	-2.0	-54.0 ± 0.8	5.7 ± 0.5	+13.0	5
R394E	-46.0 ± 1.0	7.7 ± 0.9	-0.1	-50.8 ± 0.7	7.8 ± 0.7	-0.8	4
E395A ($V_h = -90$ mV)	-62.2 ± 0.7	7.1 ± 0.6	-16.3	ND		+2.4	4
E395A ($V_h = -120$ mV)	-62.3 ± 0.5	7.8 ± 0.4	-16.4	-71.0 ± 0.7	9.2 ± 0.6	ND	4
E395D	-40.8 ± 0.7	11.6 ± 0.6	+5.1	-42.2 ± 0.6	11.6 ± 0.5	-17.8	6
E395R	-75.2 ± 0.7	9.1 ± 0.6	-30.3	-82.4 ± 0.9	8.3 ± 0.8	+11.0	6
L398A	-"					-29.2	6
L398N	-48.8 ± 0.4	9.7 ± 0.4	-2.9	-58.3 ± 0.9	9.2 ± 0.8	-"	2
L398V	-38.9 ± 1.0	12.1 ± 0.8	+7.0	-37.2 ± 1.0	11.3 ± 0.9	-5.1	3
L398I	-28.0 ± 1.9	11.0 ± 2.1	+17.9	-27.5 ± 1.2	11.0 ± 1.8	+16.0	5
L398W	-59.4 ± 1.9	24.4 ± 1.4	-13.5	-52.5 ± 1.7	26.1 ± 1.6	+25.7	3
V476A ($V_h = -90$ mV)	-65.5 ± 1.6	9.1 ± 1.4	-19.6	ND		+0.7	3
V476A ($V_h = -120$ mV)	-60.9 ± 0.7	7.6 ± 0.6	-15.0	-69.9 ± 0.5	7.8 ± 0.4	ND	3
Y485A	-48.9 ± 0.6	10.8 ± 0.5	-3.0	-50.3 ± 0.4	11.8 ± 0.3	-16.7	6
Y485F	-"					+2.9	6
Y485H	-53.8 ± 0.4	10.4 ± 0.4	-7.9	-54.8 ± 0.4	10.0 ± 0.4	-"	3
R394A/E395A	-45.7 ± 0.9	7.6 ± 0.8	+0.2	-52.2 ± 0.8	7.7 ± 0.7	+3.0	5
R394E/E395R	-64.2 ± 0.4	6.3 ± 0.3	-18.3	-69.1 ± 0.5	7.3 ± 0.4	+1.0	6
E395A/Y485A	-51.9 ± 0.6	12.7 ± 0.6	-6.0	-56.0 ± 0.4	12.0 ± 0.4	-15.9	5

Table III.I.I. Summary of gating current results in Shaker mutants.

QV were fit into a single Boltzmann distribution as described under "Experimental Procedures." $V_{1/2}$ represents the voltage at which 50% of the maximal charge has been moved. dV represents the slope of the Boltzmann curve. $\Delta V_{1/2}$ represents the difference in $V_{1/2}$ between the respective mutant and W434F non-conducting control. ND indicates that the off-gating curves could not be fit into a single Boltzmann function.

When comparing the time courses of the gating currents (Fig. 2) with the amount of gating charge moved in response to membrane depolarization (QV , Fig. 3), it becomes evident that effects on time course and on QV do not always correspond to each other. As expected from the gating current traces, QV relations for the third group of mutants, *i.e.* R394Q, R394E, and L398N, were indistinguishable from those of W434F (Fig. 3). The first group of mutants, *i.e.* E395D, L398V and/or L398I, and Y485A and/or Y485H, which eliminated the slow component in the off-gating currents, all increased the slope factors (dV , shallower slope) of their QVs . They also had in common a reduced difference between the $Q_{ON}V$ and $Q_{OFF}V$, whereas their effects on the equilibrium voltage ($V_{1/2}$) varied (Table III.I.I; Fig. 3). The difference between Q_{ON} and Q_{OFF} is likely caused by an immobilization of gating charges in the open state (see below). On the other hand, the second group of mutants all altered the $V_{1/2}$ of the QV while leaving the dV constant. The $V_{1/2}$ was increased when the slow off-gating component was accelerated (R394A) and decreased when the component was slowed down (E395R) or charges were immobilized (V476A, E395A), indicating that less energy was required to activate the voltage sensor in these three mutants. This is consistent with the idea that the activated states later in the sequence are additionally stabilized, which "pulls" the sensors into the activated state and, thus, shifts the QV to more negative potentials.

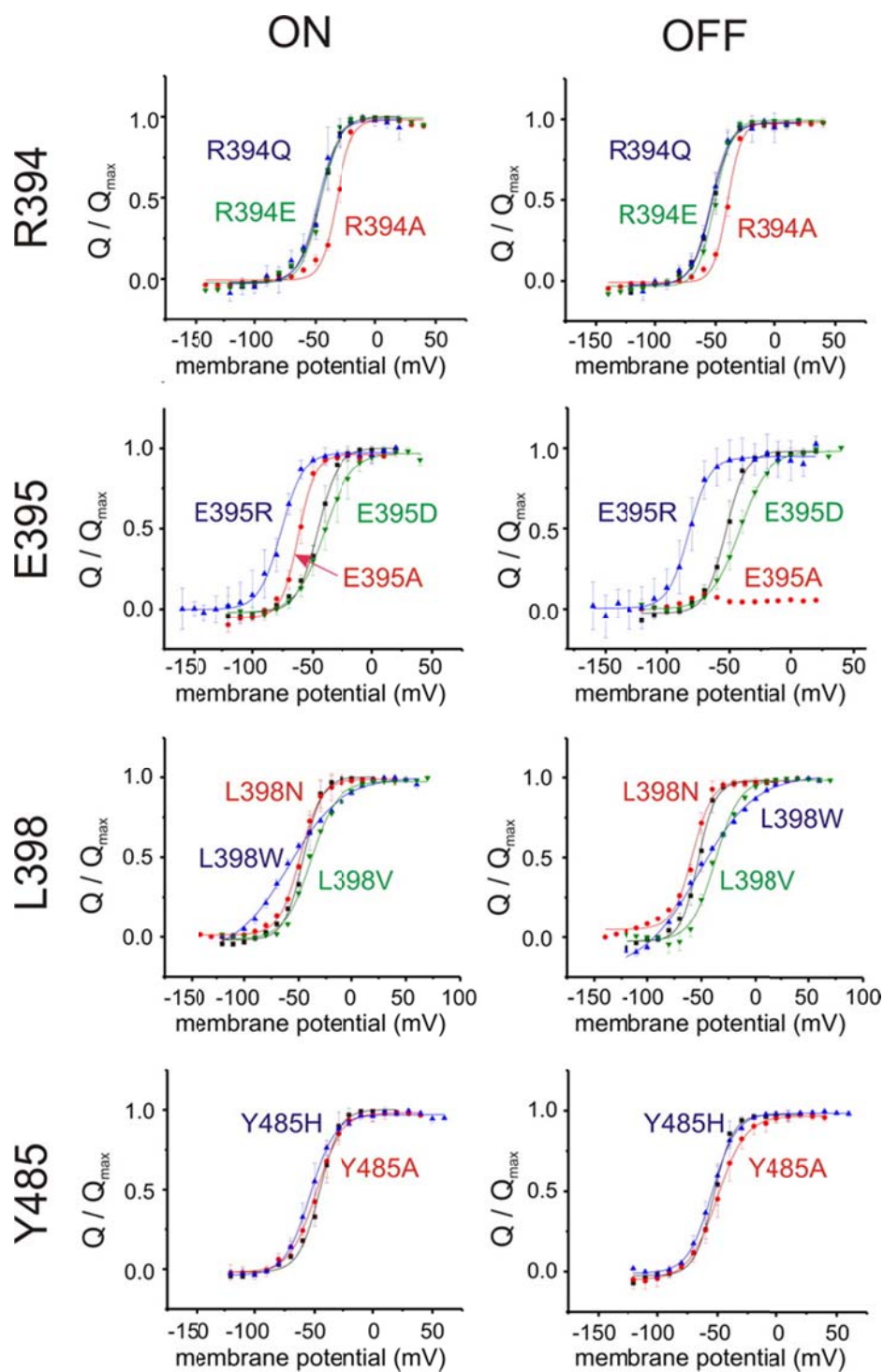


Figure 3.1.3. Voltage dependence of gating charge (Q) in Shaker mutants.

Shown are Boltzmann fits comparing normalized gating charge (Q) as a function of voltage in cut-open oocytes expressing W434F control (*black*) of the various mutants as labeled in the graphs. For E395A, the maximum off-gating charge was normalized to the average, normalized OFF-gating charge of W434F measured at the same depolarization.

L398W shifted the $Q_{ON}V$ to more negative potentials and increased the dV to 24 mV (Table III.II, Fig. 3). Yet L398W only developed a slow off-gating component at potentials higher than +60 mV, and even these were considerably accelerated in comparison to W434F (Fig. 2). The bulky tryptophan may have caused more severe changes, however. The varying effects on $V_{1/2}$ and dV , in particular for mutants that remove the slow off-gating component, imply that two complementary effects occur. As both are not strictly correlated with each other, it is likely that they reflect two different transitions along the activation pathway.

Significant differences were observed in the $Q_{OFF}V$ relations. Whereas the $Q_{OFF}V$ of E395R, whose $Q_{ON}V$ was shifted the most, still followed a typical Boltzmann distribution (Fig. 3), the $Q_{OFF}V$ of E395A and V476A instead reached their maximum relative values after depolarizations between $-60 \sim -70$ mV (Fig. 3 and 4B) and tapered off at higher potentials. In both mutants, less Q_{OFF} charge is measured compared with Q_{ON} (Fig. 4A), signifying that for both mutants the voltage sensor is “immobilized” in the activated state and only very slowly returns to the resting position. This is confirmed by the fact that the $Q_{OFF}V$ of both mutants was restored by decreasing the resting potential to -120 mV (Fig. 4B). The effect was, thus, contrary to that of mutants of the first group. We, thus, not only established that Glu-395, Leu-398, and Tyr-485 form the open state stabilization (Kanevsky and Aldrich 1999), as we can remove the interaction by mutating either one of them, but we also, with E395A and/or E395R and V476A, have a way of increasing the interaction, which gives us the unique opportunity to investigate one of the later transitions in electromechanical coupling over the background of the charge movement.

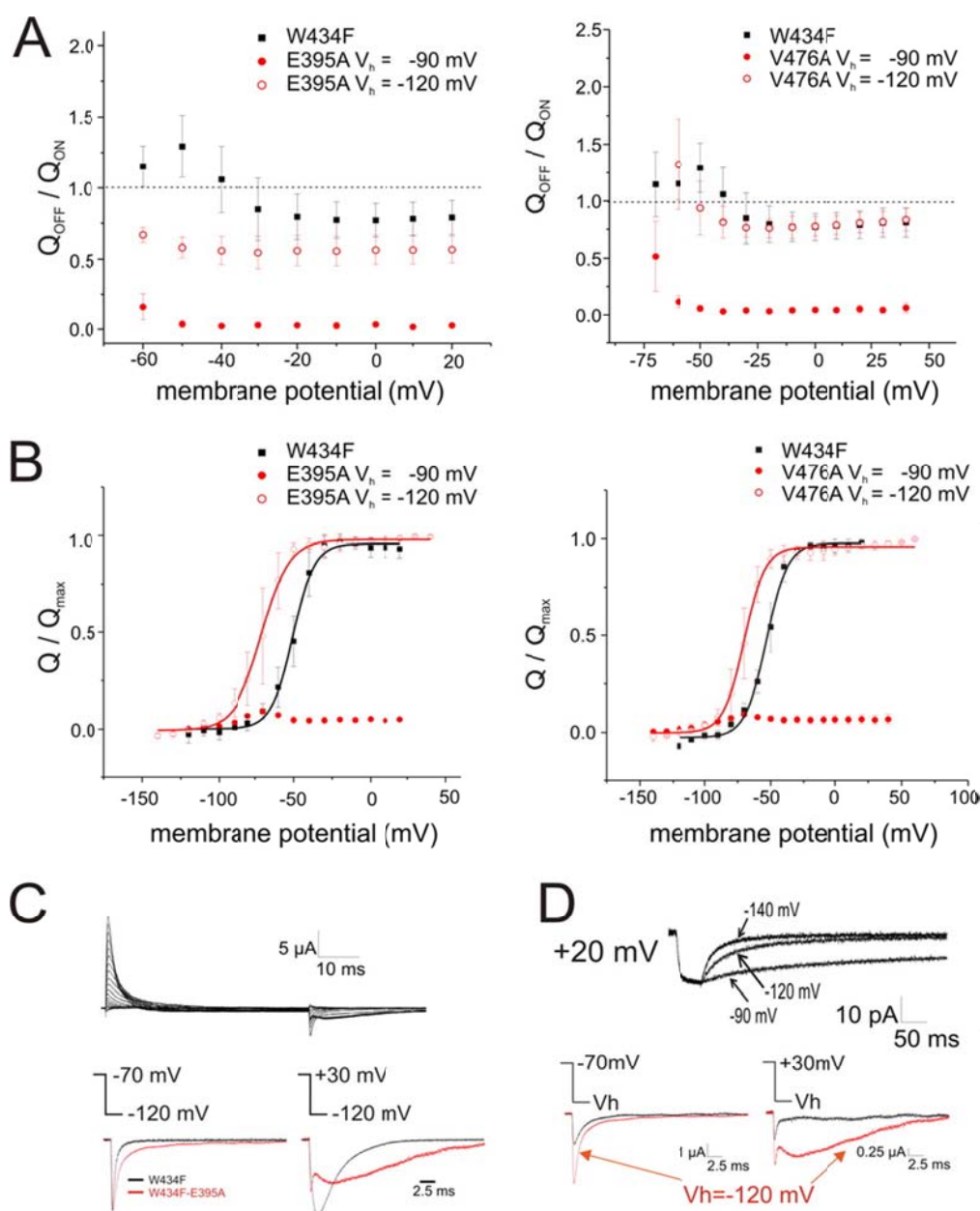


Figure 3.1.4. Recovery of off-gating charge by reducing resting potential to -120 mV in E395A and V476A.

A, shown is the $Q_{\text{OFF}}/Q_{\text{ON}}$ ratio as a function of voltage in E395A (left; $n = 4$) and V476A (right; $n = 3$). Black squares, W434F, $V_h = -90$ mV, $n = 5$; red filled circles, E395A/V476A $V_h = -90$ mV; red hollow circles, E395A/V476A $V_h = -120$ mV. Error bars show S.D. B, at a resting potential of -120 mV the voltage sensors are released from their immobilized state and allowed fitting of the data into a single Boltzmann curve. Off-gating charge and voltage relations between W434F ($n = 5$) and E395A (left; $n = 4$) and between W434F ($n = 5$) and V476A (right; $n = 3$), respectively. Black squares, W434F; red filled circles, E395A/V476A $V_h = -90$ mV; red empty circles, E395A/V476A $V_h = -120$ mV. Error bars show S.D. C, shown are representative gating traces elicited in the E395A mutant at a resting potential of $V_h = -120$ mV (top). Bottom, a comparison of off-gating between W434F (black) and W434F-E395A (red) is

shown. *D*, the fluorescence trace compares voltage sensor movement after various repolarizations as shown after depolarization to +20 mV. *Bottom*, a comparison of off-gating currents for different holding potentials (*black trace*, $V_h = -90$ mV; *red trace*, $V_h = -120$ mV) is shown.

3.1.4.2. Neutralization of E395A Stabilizes the Activated State of the Voltage Sensor

Recall that E395D and E395A lead to almost opposing effects on the slow off-gating component. E395D removed the slow component and showed fast return of the voltage sensor, whereas in E395A the off-gating could not be detected anymore for depolarizations more positive than -60 mV. In addition, neutralization of a charge in E395A led to a negative shift of the QV , indicating a strengthening of an interaction that stabilizes the open state. More specifically, for the different mutations at position 395, the $V_{1/2}$ of the QV became more negative in the order E395D (+5 mV), E395E (=wild type), E395A (-16 mV), and E395R (-30 mV), following the electrostatic charge of the residues. The diminished off-gating charge in E395A can neither be explained by the negative shift of the QV , as both E395R (Fig. 3) and W434F with a holding potential of -70 mV (data not shown) returned “normally” to the voltage sensors resting position, nor by destabilization of a transition before charge movement. More likely, an additional mechanism is responsible for the slow return of the voltage sensors, affecting a transition later in the activation pathway, prompting us to further investigate the mechanism underlying the effects of Glu-395 mutations and, thus, the nature of the stabilization of the activated voltage sensor.

For pulses to potentials at which the off-gating currents develop, the slow component in W434F, the $Q_{\text{OFF}}/Q_{\text{ON}}$ ratios of E395A showed an ~97% loss in charge movement (Fig. 4A), suggesting that the voltage sensors only return very slowly to resting potential, and accordingly, the slow off-gating component was recovered when the holding potential was reduced from -90 to -120 mV, effectively providing energy to overcome the additional interaction and return the voltage sensors (Fig. 4, B and C). The kinetics of the E395A off-gating currents were still significantly slower than that of W434F (Fig. 4C). In contrast, $Q_{\text{ON}}V$ gating relations of E395A were unaltered by changes in holding potential (data not shown). The $Q_{\text{OFF}}V$ (at $V_h = -120$ mV) was shifted to more negative potentials by ~-18 mV with respect to W434F (Fig. 4B, Table III.I.I). Because the

charges returned too slowly to detect the voltage sensor movement in the gating currents, we tracked it using voltage-clamp fluorometry. We labeled the channels at an additionally introduced cysteine (A359C) in the S3-S4 linker. Fluorescence changes from this position had been shown to monitor voltage sensor movement (Mannuzzu, Moronne *et al.* 1996; Cha and Bezanilla 1997; Cha and Bezanilla 1998). We compared the mutant E395A/W434F/A359C with its control, W434F/A359C. The return of the voltage sensor of E395A from depolarizations of >-60 mV was significantly slower (Fig. 5A). When the resting potential was decreased from -90 to -120 mV, the fluorescent decay was accelerated as before the off-gating currents (Fig. 4D) but was still significantly slower than W434F. Fitting the decay curves into two exponentials showed that E395A had an additional, 4-fold higher, slow component compared with control ($\tau = 190 \pm 17$ ms; Fig. 5A). This additional slower component was the major fraction of charge movement in E395A, whereas in wild type the faster time constant was the dominant component.

The slow kinetics of the return of the voltage sensor from the immobilized state at negative holding potential (-90 mV) was also determined by subjecting the channel to a double pulse protocol (Fig. 5B). The gating charge available for a second depolarizing test pulse ($+20$ mV) recovered to 98% only after 300 ms in E395A ($\tau = 70$ ms). In contrast, W434F control was fully recovered after 30 ms ($\tau = 7$ ms; Fig. 5B), similar to the time needed for the off-gating current to decay fully to zero. We also varied the length of a -60 -mV depolarizing pulse to determine the speed with which the mutant channel enters the immobilized state (Fig. 5C). Charges became immobilized with a time constant of $\tau = 61.4$ ms at -60 mV.

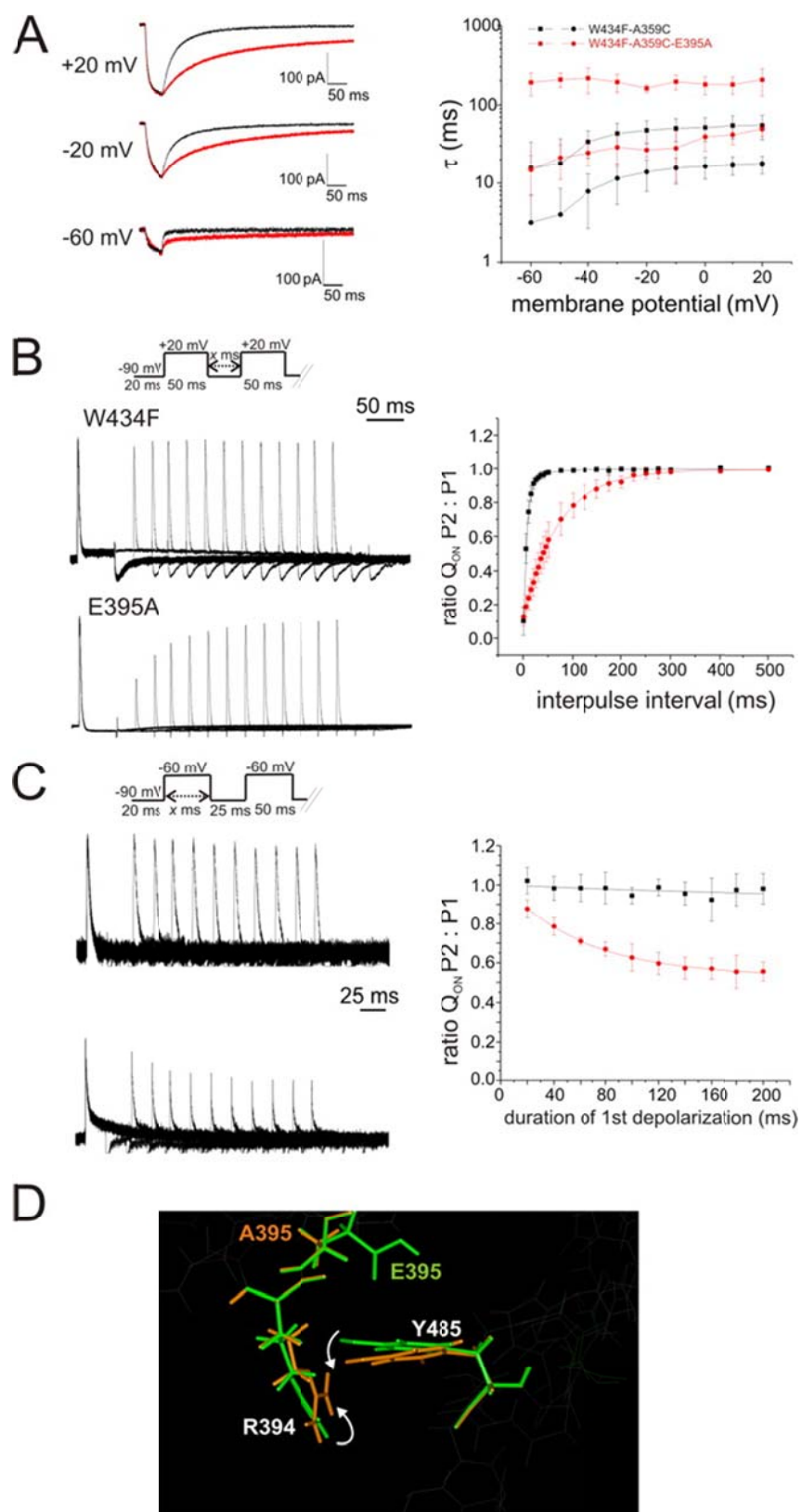


Figure 3.1.5. Charge immobilization of the voltage sensor in the E395A-W434F Shaker mutant.

A, left, shown are voltage-clamp fluorimetry results comparing W434F and E395A. Shown are representative fluorescent signals after depolarizations to +20, -20, and -60 mV (from $V_h = -90$ mV) for

W434F (*black traces*) and E395A (*red traces*). *Right*, the time constants of the fluorescent decay curves during repolarization were plotted as a function of voltage (*black*, A359C/W434F; *red*, E395A/A359C/W434F, $V_h = -90$ mV, $n = 5$ or 6 for W434F and E395A, respectively; *error bars* show S.D.). *B, left*, shown are representative gating currents of cut-open oocytes expressing W434F or E395A after two sequential saturating depolarizations at +20 mV. The interpulse interval ranged from 1 to 301 ms in 25-ms steps. Capacitive currents were subtracted with P/4 protocol. *Right*, shown is a plot of the maximum amplitude of the on-gating current after the second depolarizing pulse (*P2*) normalized to the on-gating current after the first pulse (*P1*) as a function of the interpulse interval. Results were fit to an exponential curve with $\tau = 7$ ms (W434F, *black squares*) and $\tau = 70$ ms (E395A, *red circles*) ($n = 5$, *error bars* show S.D.). *C, left*, shown is a two-pulse protocol varying the duration of the first depolarizing pulse at -60 mV from 20 to 200 ms in 20-ms intervals. Capacitive currents were subtracted with P/4 protocol. Shown are gating currents produced in cut-open oocytes expressing W434F or E395A. *Right*, maximum amplitude after P2 normalized to that after P1 plotted as a function of the duration of P1 is shown. Average data were fit into an exponential decay function with one time constant. τ_1 values were 235.7 and 61.4 ms for W434F (*black squares*) and E395A (*red circles*), respectively ($n = 4$, *error bars* show S.D.). *D*, S4-S6 regions of wild type and E327A mutant Kv1.2 (E395A in Shaker) were subjected to an energy minimization protocol. Molecular backbones of the minimized wild type (*green*) and E327A (*orange*) mutant structures were superimposed. Residue numbering is according to Shaker.

3.1.4.3. An Interaction between Arg-394 and Tyr-485 Causes Voltage Sensor Immobilization in the E395A Mutant

The delayed return of the voltage sensors characterized above is caused by an interaction that forms when the charge at position Glu-395 is neutralized. Yet the effect of mutations at position 395 is dependent on the electrostatic charge where the neutral residue (Ala in E395A) leads to the strongest interaction. This suggests that the residue is not directly responsible for the additional interaction energy. To identify the underlying molecular determinants, the region surrounding Glu-395 was modeled based on the Kv1.2 crystal structure (Long, Campbell *et al.* 2005). The structures of both wild type Kv1.2 and of the E395A mutant (E327A in Kv1.2) were compared after an energy minimization protocol that allowed residues in the surrounding of Glu-395 to move freely, whereas the rest of the molecule remained fixed. When glutamate 395 was replaced by alanine, a structural reorientation in the side chains of Tyr-485 and Arg-394 was observed (Fig. 5D). This adjustment reduced the distance between the hydroxyl group of Tyr-485 and the guanidinium group of Arg-394, implying a stronger interaction

between these oppositely charged groups. The stronger bond may account for the voltage sensor immobilization seen experimentally with E395A.

To verify that the strong bond indeed results in voltage sensor immobilization, we neutralized both Arg-394 and Glu-395 simultaneously (R394A/E395A (RE-AA)). In RE-AA, the slow off-gating components are preserved (Fig. 6A), and unlike E395A, no voltage sensor immobilization was observed. The RE-AA double mutant resembles the W434F control in both gating phenotype and energetics (Fig. 6, A and B). In contrast, the gating currents of the E395A/Y485A (EY-AA) double mutant lost the slow off-gating components (Fig. 6A), as was seen in the single mutation Y485A (Fig. 2), and exhibited QV relations similar to Y485A (Fig. 6B). Thus, in both double mutants EY-AA and RE-AA, the strong stabilization of the activated state developing in the absence of a charge at position 395 was eliminated, confirming that in E395A a strong bond develops between Tyr-485 and Arg-394. Stabilization of the activated state in the RE-AA double mutant is formed by a bond between Tyr-485 and Leu-398, and this interaction gives rise to the slow off-gating currents.

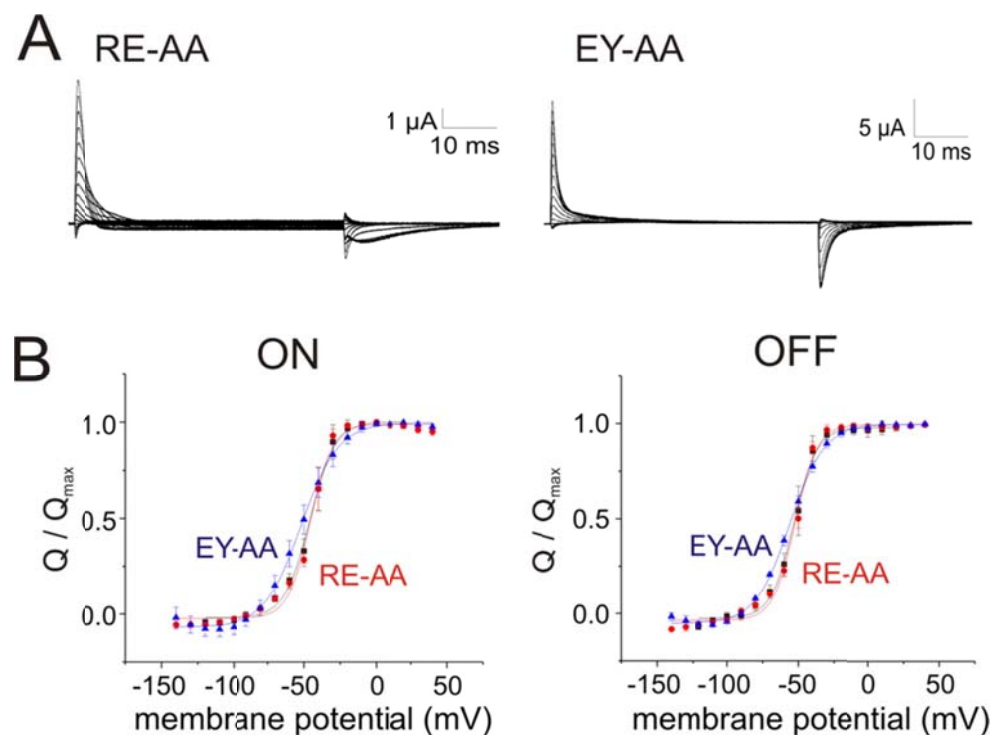


Figure 3.1.6. Gating current profiles in Shaker double mutants.

A, gating current traces representative of RE-AA and EY-AA double mutants are shown after subtraction of capacitive currents using a P/4 protocol. Oocytes expressing W434F (control) or a double mutant were held at a resting potential of -90 mV and depolarizing pulses in 10-mV increments were applied. *B*, shown are Boltzmann fits of on- and off-gating currents in cut-open oocytes expressing RE-AA (red, $n = 5$) and EY-AA (blue, $n = 5$) versus W434F control (gray, $n = 5$). Error bars show S.D.

In addition, the V476A mutation, as in the case of E395A, reduced the energy needed to activate the voltage sensor and delayed its recovery when repolarizing to resting potential (Fig. 4, *A* and *B*). In Kv4.2, V476A and E395A had been suggested to interact with one another supported by double mutant cycle analysis (Barghaan and Bähring 2009). However, our fluorescence measurements show that both mutations (E395A and V476A) lead to open state stabilization. Thus, they add an interaction that occurs elsewhere (namely, between Arg-394 and Tyr-485). Inspection of the Kv1.2 crystal structure indicates that Val-476 is located close to Glu-395 of the adjacent subunit. We assume that Val-476 helps to properly position Glu-395 in the context of an RELY intersubunit interaction. Replacement of Val-476 with alanine allowed Glu-395 to swing away, allowing the strong bond between Arg-394 and Tyr-485.

3.1.4.4. Pore Opens in Y485A in the Absence of Slow Component

The occurrence of the slow component has previously been associated with pore opening (Perozo, MacKinnon *et al.* 1993; McCormack, Joiner *et al.* 1994; Chen, Steele *et al.* 1997). Thus, we had to ascertain that the electromechanical coupling between voltage sensor and pore was still intact because the slow component would not be able to develop if the mutant channel does not open. To this end, we elicited ionic currents in parallel with fluorescent traces that tracked the movement of the voltage sensor (A359C) in conducting wild type and mutant channels (E395A and/or E395D, Y485A) in response to a series of depolarizations. Similar to the QV gating relations (Fig. 3), FV relations of E395A/A359C were negatively shifted compared with control, confirming activation of its voltage sensor at lower depolarizations (Fig. 7A, Table III.I.II). The GV was also shifted to more negative potentials ($V_{1/2} = -52$ mV). The mutation Y485A/A359C yielded FV relations not significantly different from control (Fig. 7A, Table III.I.II), a finding similar to Y485A QV relations. In Y485A/A359C, a shift to

more positive potentials and a shallower slope of the GV curve compared with A359C was observed. QV and GV were, thus, further separated than in wild type, and the voltage dependence was less steep. The fact that the pore opening occurs at higher potentials suggests that the intersubunit bridge in the wild type channel pulls the pore into the open state. This energy is missing for opening the pore in Y485A. Nevertheless, because no slow off-gating component developed even at depolarizing pulses to voltages where the channel opened (100 mV), we can conclude that suppression of the slow off-gating component by the alanine replacement of Tyr-485 is not caused by interruption of electromechanical coupling but by direct disruption of the interaction, giving rise to the slow component. For E395D, a similar effect was observed (Fig. 7A).

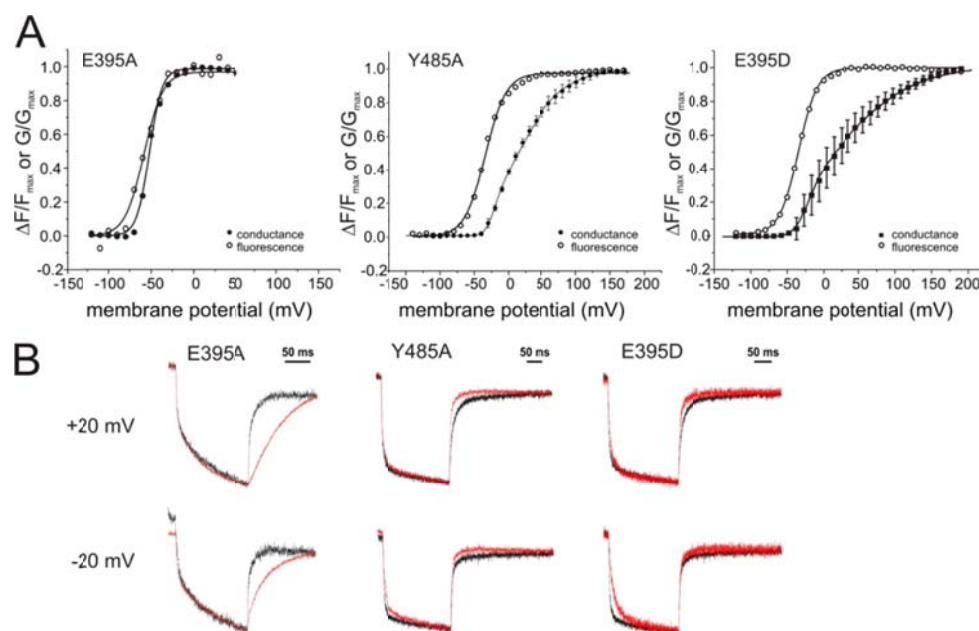


Figure 3.1.7. Electromechanical uncoupling of the voltage sensor and pore in Y485A and E395D mutants.

A, shown are plots of conductance ($\Delta G/G_{\max}$) and fluorescence ($\Delta F/F_{\max}$) as a function of voltage in E395A/A359C, Y485A/A359C, and E395D/A359C mutants. *Black-filled* and *open symbols* represent normalized conductance and relative fluorescence change of the mutants E395A (conductance $n = 8$; fluorescence $n = 4$); Y485A (conductance $n = 6$; fluorescence $n = 8$); E395D ($n = 6$); *error bars* show S.D. B, voltage-clamp fluorometry results are shown comparing A359C with Y485A/A359C and E395D/A359C (*right*) and comparing M356C/T449Y with E395A/M356C-T449Y (*left*). Shown are representative fluorescent signals after depolarizations to +20 and -20 mV (from $V_h = -90$ mV) of mutant as shown (*red traces*) compared with their respective control (*black traces*).

Shaker construct	I_{gating}							
	G				$\Delta F/F_{max}$			
	$V_{1/2}$	dV	$\Delta V_{1/2}$	n	$V_{1/2}$	dV	$\Delta V_{1/2}$	n
<i>mV</i>	<i>mV</i>	<i>mV</i>		<i>mV</i>	<i>mV</i>	<i>mV</i>		
A359C	-21.0 ± 1.2	15.9 ± 1.0		5	-39.6 ± 2.7	20.9 ± 2.3		4
E395A/A359C	-52.1 ± 0.6	7.4 ± 0.5	-31.1	8	-58.4 ± 1.3	11.1 ± 0.1	-18.8	4
E395D/A359C	-14.9 ± 1.8	11.0 ± 1.8		6	-34.8 ± 0.3	12.9 ± 0.3	+4.8	6
Y485A/A359C	$+21.6 \pm 1.7$	50.0 ± 2.5		6	-33.9 ± 0.6	15.1 ± 0.6	+5.7	8
A359C/W434F	-17.3 ± 1.8	11 ± 1.4			-33.7 ± 0.3	12.5 ± 0.3		5
E395A/A359C/W434F	$+14.4 \pm 1.8$	38.0 ± 1.8			-56.2 ± 0.5	12.3 ± 0.4	-22.5	6

Table III.II. Summary of ionic current and fluorescence results in Shaker mutants.

GV and FV relations were fit into a single Boltzmann distribution as described under “Experimental Procedures.” $V_{1/2}$ represents the voltage at which 50% maximal conductance has been reached. dV represents the slope of the Boltzmann curve. $\Delta V_{1/2}$ represents the difference in $V_{1/2}$ between the respective mutant and A359C conducting control.

The GV curves of both Y485A and E395D did not follow simple Boltzmann relations but had to be fitted to double Boltzmann curves (Y485A: $V_{1/2,1} = -17.3$ mV ($dV_1 = 11$ mV); $V_{1/2,2} = 14.8$ mV ($dV_2 = 38$ mV); E395D: $V_{1/2,1} = -14.9$ mV ($dV_1 = 11$ mV); $V_{1/2,2} = 21.6$ mV ($dV_2 = 50$ mV)); see “Experimental Procedures”). This indicated that pore opening is governed by two different transitions with different voltage dependence. A double Boltzmann relation occurs if two (or more) voltage-dependent transitions in series have to be passed before the observable (conductance) may change. In most cases the result would be similar to a single Boltzmann relation. It is only when the two slopes of the voltage dependences are very different that a significant influence on the observable (here GV) is noted. The fits of Y485A and E395D GV s show that the second transition represented in the double Boltzmann has become very broad. This is likely due to the lack of open state stabilization (see Fig. 9C) when eliminating the interaction responsible for the slow component in Y485A and E395D. In contrast, voltage sensor movement (QV) is left unaltered, indicating that the final open transition does not influence the state of the voltage sensor.

3.1.4.5. The RELY Interaction also Develops under Physiological Ion Permeation

We have demonstrated that in the non-conducting mutant W434F an interaction develops between the residues Arg-394, Glu-395, Leu-398, and Tyr-485, which we will abbreviate as RELY interaction, stabilizing the activated state of the channel.

Nevertheless, concerns that the slow off-gating component may not develop at physiological conditions need to be addressed as it had been suggested that the non-conducting phenotype of W434F Shaker channels is due to C-type inactivation and that the slow off-gating component arises from this feature (Starkus, Kuschel *et al.* 1997; Yang, Yan *et al.* 1997), although results of other authors are more consistent with an open state stabilization than with C-type inactivation (Chen, Steele *et al.* 1997; Kanevsky and Aldrich 1999). In addition, it had been proposed that different permeant ions variably alter the kinetics of the off-gating currents (Chen, Steele *et al.* 1997; Starkus, Kuschel *et al.* 1998; Varga, Rayner *et al.* 2002).

To confirm that the RELY interaction also develops under physiological conditions of ion permeation, we carried out fluorescence voltage-clamp measurements of the conducting mutants as well as their respective wild type controls labeled at an additionally introduced cysteine at position A359C or M356C. Using fluorescence to trace the movement of the voltage sensors at physiological conditions obviates the need to vary the permeating ion or use non-physiological ion concentrations. We can, rather, follow the movement during normal ion conduction that prevails under physiological function of the channel.

We first compared the off-decay of the fluorescence during repolarization from varying depolarizations of the wild type channel to the non-conducting mutant W434F and the conducting mutant T449Y, which very slowly develops C-type inactivation (Ogielska, Zagotta *et al.* 1995). To this end an additional cysteine was introduced at position M356C of each channel. No difference in the fluorescence signal between wild type and T449Y was observed. Comparison of the fluorescence decay to W434F revealed, however, that wild type fluorescence initially returned significantly faster than W434F fluorescence (Fig. 8C). The fast initial decay was followed by a slower component, which is comparable with (or slower than) W434F/M356C. Accordingly, we found two time constants each for wild type and W434F. In W434F, the time constants were slower in comparison to wild type and T449Y (Fig. 8A). At the same time, the amplitude of the slower component (≈ 60 ms) only accounted for a small fraction of total charge movement (10–15%) of the entire fluorescence intensity decay of W434F compared with 40% in wild type (Fig. 8B). The time constants found in the off-gating currents of

W434F were consistent with the major faster component in the off-fluorescence decay. The slow component found in the off-gating current kinetics of W434F, thus, seems to be represented by the slower fluorescence component in wild type and the faster one in W434F.

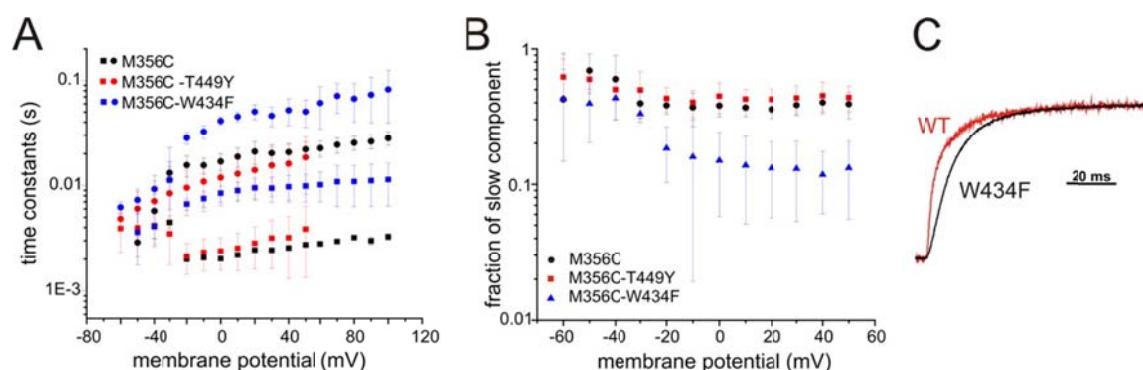


Figure 3.1.8. Voltage sensor movement in the presence of permeating ions.

A, time constants of double exponential fits to fluorescence decay after depolarizing pulses for ShakerIR-M356C (*black*), ShakerIR-M356C/T449Y (*red*), and ShakerIR-M356C/W434F (*blue*) are shown. *B*, shown is the fraction of the slower time constant in fluorescence traces analyzed in *A*. *C*, shown is a comparison of two fluorescence decays after a depolarizing pulse to +20 mV (*red*, Shaker-IR-M356C (wild type (*WT*)); *black*, Shaker-IR-M356C/W434F).

We next compared E395A, E395D, and Y485A fluorescence data with wild type to confirm that their effects on the gating currents persist in the conducting channel. The stabilization of the voltage sensors was evident when comparing the fluorescence decay of E395A in the conducting (A359C or M356C-T449Y) channels to their respective controls (Fig. 7B). The voltage sensor movement upon return from depolarizations >-60 mV was, as in the non-conducting mutant, significantly slower. No C-type inactivation was observed during the time course of the depolarizing pulse, indicating that the voltage sensors are still immobilized under physiological ion conduction and that this immobilization is independent of C-type inactivation.

When comparing the fluorescence signals of Y485A and E395D with wild type in the conducting mutant, we observed an accelerated decay of fluorescence traces tracking the voltage sensor during deactivation. This is consistent with the absence of the slow off-gating component (Fig. 7B). Thus, also the fast off-gating decay seen in Y485A and E395D is preserved under physiological ion permeation.

The above results indicate that the slow component is still found in the conducting wild type channel, although it is accelerated in comparison to W434F as it was proposed earlier (Chen, Steele *et al.* 1997; Starkus, Kuschel *et al.* 1998; Varga, Rayner *et al.* 2002). Both acceleration of voltage sensor movement by elimination of the RELY interaction (Y485A, E395D) and slow voltage sensor return by strengthening the stabilization (E395A) are observed in the conducting channel as in the W434F mutant. The slow off-gating components and the RELY interaction do not seem to be specific to W434F or related to C-type inactivation.

3.1.4.6. The RELY Interaction Correlates with Channel Opening

It still remains to be established whether the RELY interaction is formed in the open state or whether it is maintained from an earlier transition. We, therefore, tested the effect of the K⁺ channel blocker 4-AP on gating currents (W434F) and ionic currents (wild type) in E395A and Y485A. 4-AP has been described to stabilize channels in an “activated-not-open” state because 4-AP blocks the final transition of the intracellular activation gate (McCormack, Joiner *et al.* 1994; Armstrong and Loboda 2001; Loboda and Armstrong 2001; del Camino 2005; Pathak, Kurtz *et al.* 2005). In both mutants and wild type, ionic current was blocked by the addition of 4-AP. In the gating current traces of the W434F control, 4-AP eliminated the slow off-gating components (Fig. 9A), as shown previously (Loboda and Armstrong 2001). 4-AP also altered the off-gating kinetics of E395A, as a slow component was observed similar to W434F but faster than E395A in the absence of 4-AP (Fig. 9). 4-AP facilitated, thus, a faster return of the off-gating charge, indicating that in the E395A mutant an interaction still developed between Arg-394 and Tyr-485 even in the presence of 4-AP, although this interaction is not as strong as in the absence of 4-AP. This shows that the RELY interaction partners are close enough to develop an (electrostatic) interaction if the channel is in the activated, not-open state but are prevented from assuming their native configuration required to develop the open state stabilization observed in wild type. The final opening step, therefore, seems closely related to the development of the RELY interaction.

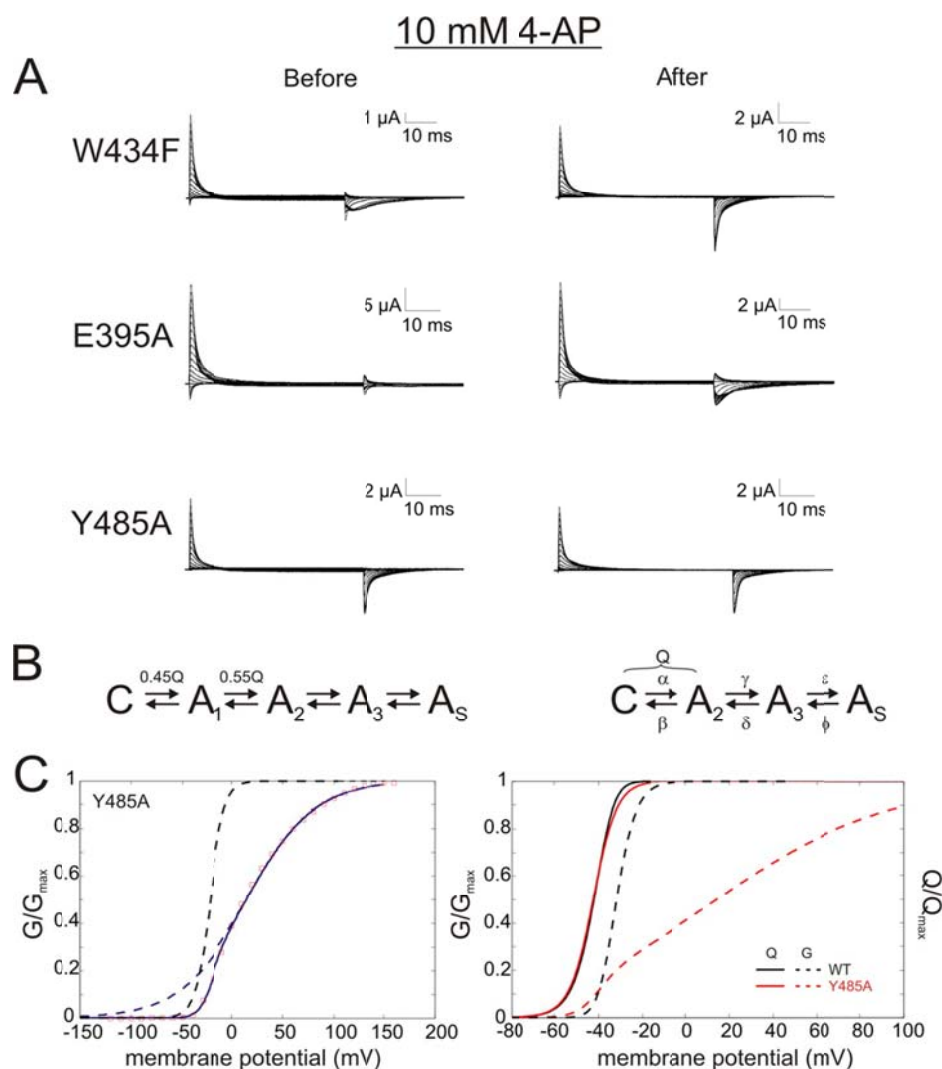


Figure 3.1.9. Slow OFF-gating components during voltage sensor deactivation are partially restored by 4-AP in the E395A mutant.

A, shown are representative gating current traces in W434F control, E395A, and Y485A mutants before and after the addition of 10 mM 4-AP (W434F, $n = 4$; E395A, $n = 3$; Y485A, $n = 5$). B, 5-state model used to fit the data (left; see “Experimental Procedures”) and reduced model combining all charge carrying steps into the first transition (right) are shown. C, left, shown are GV and the double Boltzmann fit of ShakerIR-Y485A. The dashed lines visualize the two components of the double Boltzmann relation; right, modeling the effect of destabilization of the last transition on QV and GV is shown. The first two transitions of the reduced model were left unaltered, whereas the values from the fit (left, $V_{1/2} = 14.8$ mV, $dV = 38$ mV) were used for the last transition (red, Y485A; blue, wild type; solid line, QV; dashed line, GV; see “Discussion: for details”).

4-AP did not change the gating patterns of Y485A (Fig. 9A) or EY-AA (data not shown). Fast off-gating decay was still observed in both mutants, confirming that in Y485A the last transition associated with the slow component is not rate-limiting.

3.1.4.7. Structural Interactions of Tyr-485 Represent Late Closed States in the Activation Pathway; a Five-state Activation Model

Three different effects have been observed when disrupting the RELY interaction; (i) the modulation of the “strength” of the stabilizing interaction; (ii) alteration of the QV s, and (iii) GV s that follow a double Boltzmann characteristic. These effects have to be explained. We, therefore, fitted the gating current traces to a five-state sequential model (Fig. 9B, *left*). The model contains two initial transitions that carry charge. These are followed by two further transitions representing the later steps of electromechanical coupling. With this model we were able to well fit all gating currents at different voltages (supplemental Fig. 1, see “Experimental Procedures” for details).

The rate constants showed the basic features that explain the occurrence of the slow component in the gating currents. For W434F, we found two voltage-dependent transitions with $V_{1/2}$ of -25.1 mV ($C \rightarrow A_1$) and -83.4 mV ($A_1 \rightarrow A_2$) (supplemental Fig. 1). The last transition ($A_3 \rightarrow A_S$) also showed a voltage dependence with a $V_{1/2}$ of -50.0 mV. Two features are of interest here; (i) the first transition has a higher $V_{1/2}$ than the second one, which means that the second transition pulls the first transition open (thus, $V_{1/2}$ of the QV is lower than -25.1 mV, see “Discussion”); (ii) the last transition seems to show a voltage dependence, which may arise from a genuine voltage dependence of the opening step but which may also hint at cooperative interaction. With increasing probability of the neighboring subunits to dwell in the activated state, the rate constant of entering the open stabilized state increases as well.

We compared these values with fits of the two mutants Y485A and E395A, which represent the two extremes of eliminating and strengthening the open state stabilization. In E395A, we found two differences compared with W434F; first, the last transition from $A_3 \rightarrow A_S$ was much stronger (ratio forward to backward rate higher), and the forward rate always remained larger than the backward rate, which itself corresponded to the value of W434F. Second, the $V_{1/2}$ of the $C \rightarrow A_1$ transition was shifted to -38 mV. The $V_{1/2}$ of the second transition ($A_1 \rightarrow A_2$) could not be determined because, also in this case, the forward rate remained larger than the backward rate within the experimental voltage range. During return of the voltage sensors to the resting state, the movement is,

therefore, driven by the first transition only. This first transition has to pull the sensors against the subsequent transitions, which all favor the activated position. This led to the negative shift of the QV and the slow return of the voltage sensors.

In Y485A, the $C \rightarrow A_1$ transition was, although slightly accelerated, similar to W434F, with a $V_{1/2}$ of -23.6 mV. The second transition was similar to W434F as well, which explains that the QV is not significantly shifted with respect to wild type. However, the last transition has a very fast backward rate, which is always faster than the forward rate. The dwell time in the last state is, thus, very short. This reflects the missing activated (open) state stabilization due to lack of Tyr-485. Although E395A stabilizes the final open state (A_S) strongly in Y485A, the rate constants suggest that the state is never entered, confirming a lack of some of the structural determinants. Both results are in accordance with the RELY intersubunit interaction.

3.1.5. Discussion

The interface between the S4-S5 linker and S6 plays a key role in coupling between voltage sensor and pore domain in voltage-gated K^+ channels. In the Kv1.2 crystal structure (Long, Campbell *et al.* 2005), portions of these two α -helical regions lie in close proximity to one another. Furthermore, past experiments have identified specific residues on the S4-S5 linker and S6 C terminus as critical for pore opening by the voltage sensor (electromechanical coupling) (Chen 2001; Lu, Klem *et al.* 2001; Lu, Klem *et al.* 2002; Tristani-Firouzi, Chen *et al.* 2002; Decher, Chen *et al.* 2004; Labro, Raes *et al.* 2008). In the present study we identified an interaction in Shaker K^+ channels (RELY interaction) involving residues located at the junction of the C-terminal S4-S5 linker and the S5 (Arg-394, Glu-395, Leu-398) of one subunit and the C-terminal S6 of the adjacent subunit (Y485A). The RELY interaction brings about the open state stabilization of Shaker K^+ channels, which has previously been suggested to represent the final transition from the last closed state to the open state in the activation pathway (Zagotta and Aldrich 1990; Perozo, MacKinnon *et al.* 1993; Bezanilla, Perozo *et al.* 1994; Hoshi, Zagotta *et al.* 1994; Stefani, Toro *et al.* 1994; Loboda and Armstrong 2001). The fact that the identified interaction acts across different subunits suggests immediately itself that this last transition is involved in the concerted opening of the

pore. Evidence for the significance of the three residues Glu-395, Leu-398, and Tyr-485 is their high conservation among voltage-dependent K^+ channels (Fig. 1B). We demonstrated using voltage clamp fluorometry that the RELY interaction develops under physiological ion permeation, although the slow component is, in the presence of ionic current, accelerated with respect to W434F in accordance to previous results (Chen, Steele *et al.* 1997; Starkus, Kuschel *et al.* 1998; Varga, Rayner *et al.* 2002).

Our results are consistent with previous reports. Two of the residues involved, Glu-395 and Leu-398, fall within the region mapped by Soler-Llavina *et al.* (Soler-Llavina, Chang *et al.* 2006) to disturb electromechanical coupling. Tyr-485 is part of the YFYH⁴ motif suggested by Lu *et al.* (Lu, Klem *et al.* 2002) to couple S6 to the S4-S5 linker. Two mutants other than the ones in this manuscript have been described earlier to abrogate the slow off-gating component while leaving electromechanical coupling intact. Y485C (Ding and Horn 2003) and F481W (Hackos, Chang *et al.* 2002) lacked the slow off-gating components without interrupting electromechanical coupling. The results of mutation Y485C confirm the key role of Tyr-485 for the open state stabilization that we suggest here, in particular, as the authors describe that the $V_{1/2}$ of the GV was not shifted in this channel, thus verifying that the electromechanical coupling is not interrupted by mutating Tyr-485 (Ding and Horn 2003). As for Phe-481, it is located directly above Tyr-485 such that it is likely that the bulky tryptophan influences the RELY interaction.

Although the slow component was not related to C-type inactivation or specific to the W434F mutation, it was related to pore opening. In the two mutants Y485A and E395D, both of which remove the slow off-gating component, the pore still opened voltage-dependently, indicating that electromechanical coupling remained intact. However, the final pore opening transition was governed by (at least) two sequential voltage-dependent transitions. Because of the lack of open state stabilization, the last transition has a shallower voltage dependence, leading to the double Boltzmann GV s of Y485A and E395D, although the QV remained the same.

The different effects of the Y485A and E395D mutations on QV and GV are explained by the different dependences of charge movement and pore opening on the late

transitions of electromechanical coupling. The major charge-carrying transitions occur during the movement of the S4 helix. It is, therefore, unlikely that mutations at the C-terminal S4-S5 linker or S6 would directly influence the “electrical transition energy.” Rather, the “mechanical load” on the S4 movement is varied either by pulling the sensor into a more stable position (open state stabilization) or by preventing such a transition. We, thus, cannot directly alter the slope of the charge carrying (early) transitions because the slope is determined by the contributing gating charges. Nevertheless, the QV of Y485A features a decreased slope but was hardly shifted, whereas the GV is far shifted and very shallow. These effects may be caused by altering the later transitions (non-charge carrying) in our proposed model. To illustrate it better, we combine the first two states such that only one charge-carrying transition remains (Fig. 9B, right). In this case, the gating charge is according to Equation 4 given by,

$$Q = 1 - \frac{1}{1 + \frac{\alpha}{\beta} \left(1 + \frac{\gamma}{\delta} \left(1 + \frac{\epsilon}{\phi} \right) \right)} \quad (3.5)$$

whereas the conductance will be given by A_s ,

$$G = A_s = \frac{1}{1 + \frac{\phi}{\epsilon} \left(1 + \frac{\delta}{\gamma} \left(1 + \frac{\beta}{\alpha} \right) \right)} \quad (3.6)$$

As outlined under “Experimental Procedures,” subsequent transitions cannot shift the equilibrium (and, thus, the QV) to more positive potentials than the equilibrium of the charge carrying transition ($V^{1/2}$, $\alpha = \beta$) or any other transition ($A_2 \rightarrow A_3$) occurring earlier in the sequence.⁵ On the other hand, stabilization of a subsequent transition will shift the equilibrium (and, thus, the QV) to more negative potentials. The most positive $V^{1/2}$ values observed were -28 and -32 mV for L398I and R394A, respectively. A value close to these potentials should, thus, be smaller or equal to the “native” $V^{1/2}$ of the charge-carrying transition. The value corresponds well to our fitting results for the first transition $C \rightarrow A_1$ (-25.1 mV W434F; -23.6 mV Y485A). A destabilization of the last state (shifting it to more positive potentials), as we proposed for Y485A, would, thus, leave the $V^{1/2}$ of the QV unaltered if the transition was already more positive than any of the previous ones. One would, however, observe a slight decrease of the slope. The GV , in contrast, is controlled primarily by the last transition. According to Equation 6, an

earlier transition ($C \rightarrow A_2$, $A_2 \rightarrow A_3$) can never shift the GV to more negative potentials than the last transition. A destabilization of the last state would, therefore, strongly shift the GV to more positive potentials. Fig. 9C, *right*, shows the results for the QV and GV if the last transition is shifted to the values of $V_{1/2}$ and dV observed for the GV of Y485A (*red*) while leaving the first two transitions untouched. Just by changing the subsequent transitions of electromechanical coupling, we are, thus, able to explain the opposing effects on GV and QV in the E395D and Y485A mutants.

In this context, the fact that mutating position Glu-395 leads to an increasing shift of the $V_{1/2}$ of the QV s following the electrostatic charge of the residue (E395D, +5 mV; E395E, 0 mV; E395A, -16 mV; E395R, -30 mV) suggests that a more positive charge at this position stabilizes the activated state of the voltage sensor. Mutations at this position had a strong influence on the $V_{1/2}$ of the QV , whereas elimination of open state stabilization in E395D, L398V, L398I, Y485A, Y485H, or Y485C only had small effects on the QV relations. In E395A, one of the last transitions of electromechanical coupling (little or no gating charge) has been shifted to more negative potentials. That will pull the voltage sensor into the activated state, leading to a negative shift of the QV , which is, according to Equation 5, allowed. It is possible that two different effects occur in the E395A mutant. An electrostatic interaction might occur in the electromechanical coupling sequence before the actual open state stabilization. Considering that the Y485F mutant did not express, which indicates an important role for the Tyr-485 hydroxyl group, it is likely that the electrostatic interaction between Glu-395 and Arg-394 and the polar hydroxyl group of Tyr-485 is responsible for the dependence on the electrostatic charge of Glu-395. Accordingly, in the EY-AA double mutant no significant shift of the QV was observed.

For the positions Leu-398 and Arg-394, it appears that size and atomic structure of the residue rather than the electrostatic charge are decisive for its influence on gating charge movement. R394A shifts the QV to more positive potentials. Although a charge is neutralized in R394A, R394E (charge reversal) or R394Q (neutralization) do not have the same effect as R394A. However, arginine, glutamine, and glutamate, all longer than alanine, have in common an NH_2 or OH group at the $C\delta$ position, suggesting at this position the interaction with the tyrosine occurs. One likely possibility would be a

hydrogen bond with the hydroxyl group of Tyr-485. This is supported by the fact that Arg-394 forms a very strong interaction with Tyr-485 in the E395A mutant, which disappears in both the RE-AA and the EY-AA double mutants.

A similar dependence on the size and structure of the residue is found for mutations at position Leu-398. The $V_{1/2}$ of the Leu-398 mutants is shifted with respect to wild type in the order L398I (+18 mV), L398V (+7 mV), L398L (0 mV), L398N (-3 mV), and L398W (-11 mV); of these mutations only L398I and L398V eliminated the slow off-gating component. The single difference between isoleucine and leucine is a methyl group (C δ 2 in leucine) attached to the C β instead of C γ . Asparagine, in contrast, has the identical basic structure as leucine but has polar groups attached to C γ . The replacement of C δ 2 by NH₂ in asparagine has no significant influence on the binding to the tyrosine. The group at position C δ 2, thus, appears to interact with Tyr-485 to stabilize it in the open state. The position of Leu-398 in the Kv1.2 crystal structure suggests formation of a CH- π interaction (Okumura, Sano *et al.* 2007; Coquiere, de la Lande *et al.* 2009) between the aromatic ring of Tyr-485 and C δ 2. Neither isoleucine nor valine contain a C δ 2 group and, thus, are not positioned to develop the π interaction. Therefore, no slow component develops in these mutants. In the mutant L398W it is more likely that the bulky tryptophan residue disturbed the packing in this region (Soler-Llavina, Chang *et al.* 2006).

From the above analysis of the results of the single positions and their interrelations emerges a picture of the mechanism of open state stabilization. After (not necessarily with a temporal delay) the movement of the voltage sensor, the electrostatic charges of Glu-395 and Arg-394 interact with the hydroxyl group of Tyr-485. This interaction leads to a conformational change, during which Tyr-485 enters a pocket formed by Arg-394, Glu-395, and Leu-398 (and possibly Val-476; Fig. 1A) where Tyr-485 is stabilized by short range interactions. The resulting conformational change is linked to pore opening. The proposed mechanism is in accordance to our results obtained with the blocker 4-AP. Although the long-reaching electrostatic interaction still develops and slows down the return of the voltage sensors to resting position in E395A, development of the interaction Leu-398-Tyr-485 is prevented by 4-AP. Thus, the open state stabilization is

an integral mechanism in the final steps of pore opening in both conducting and non-conducting channels and may be linked to the concerted opening.

3.1.6. Conclusion

In this study we demonstrated the physiological role of the RELY interaction between the S4-S5 linker of one subunit with the S6 of the adjacent subunit. We established that the RELY intersubunit interaction develops open state stabilization in a functional channel under physiological conditions, giving rise to the slow off-gating component. Studying the process of electromechanical coupling provides not only invaluable insight into the fundamentals of ion channel function but also practical understanding of certain diseases linked to mutations in voltage-gated channels. For instance, the mutation E395D, which abrogates the open state stabilization, has been described to cause a neurological disorder, episodic ataxia type I (Imbrici, D'Adamo *et al.* 2006), that manifests in sporadic loss of motor control. This suggests that an impaired concerted opening event due to disrupted interactions at the interface of S4-S5 linker and S6 underlies one type of this disease.

3.1.7. Acknowledgments

We thank M. Marsolais for technical assistance and P. M. Espinosa and J. Blanchet for assistance with INSIGHT II.

3.1.8. Supplementary Data

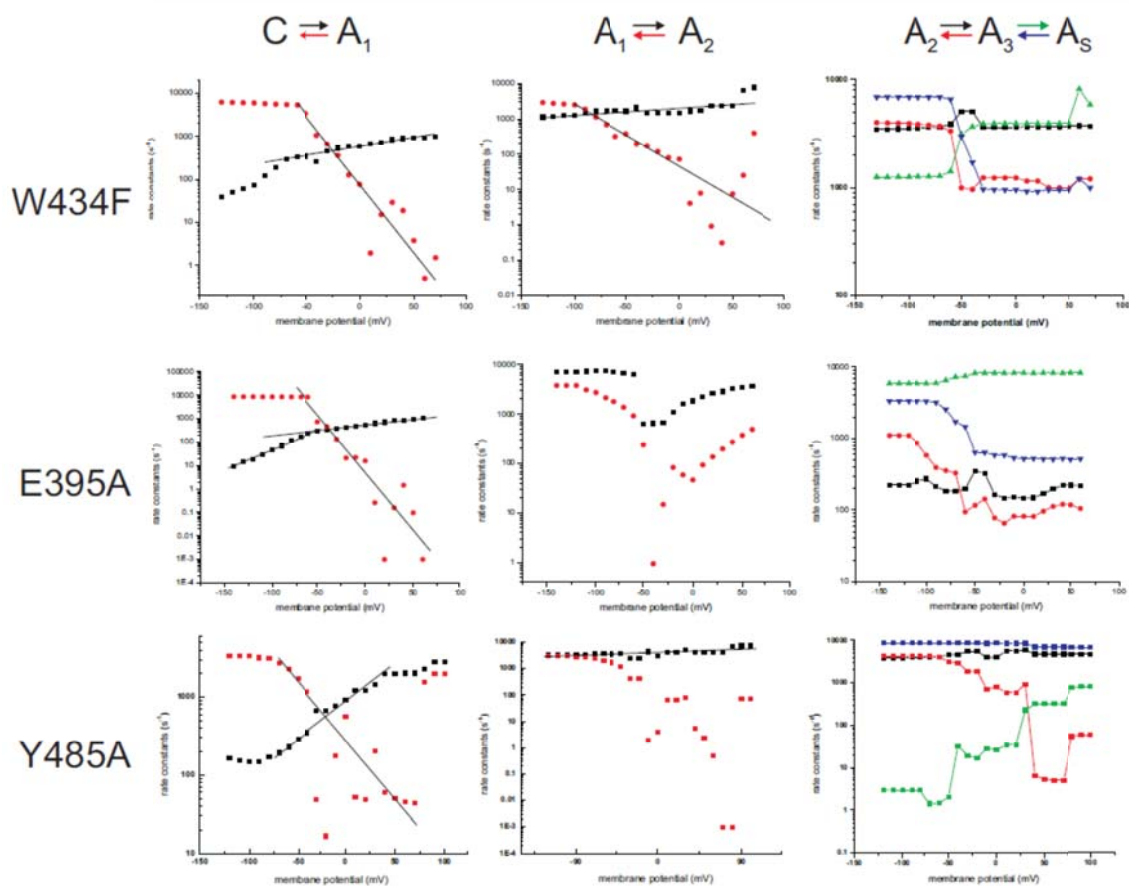


Figure 3.1.10. (Supplementary) Results of the kinetic modeling.

Results of fitting the gating currents of W434F (top), E395A (center) and Y485A (bottom) to the model shown in figure 9B. The step in the model to which the rate constants belong are depicted above. (left: black $C \rightarrow A_1$, red $C \leftarrow A_1$; center: black $A_1 \rightarrow A_2$, red $A_1 \leftarrow A_2$; right: black, $A_2 \rightarrow A_3$, red $A_2 \leftarrow A_3$, green, $A_3 \rightarrow A_S$, blue $A_3 \leftarrow A_S$).

3.1.9. Reference

Armstrong, C. M., F. Bezanilla, et al. (1973). "Destruction of sodium conductance inactivation in squid axons perfused with pronase." J Gen Physiol **62**(4): 375-391.

Armstrong, C. M. and A. Loboda (2001). "A model for 4-aminopyridine action on K channels: similarities to tetraethylammonium ion action." Biophys J **81**(2): 895-904.

Barghaan, J. and R. Bahring (2009). "Dynamic coupling of voltage sensor and gate involved in closed-state inactivation of kv4.2 channels." J Gen Physiol **133**(2): 205-224.

Bezanilla, F. (2008). "How membrane proteins sense voltage." Nature Reviews Molecular Cell Biology **9**(4): 323-332.

Bezanilla, F. and C. M. Armstrong (1974). "Gating currents of the sodium channels: three ways to block them." Science **183**(126): 753-754.

Bezanilla, F., E. Perozo, et al. (1994). "Gating of Shaker K⁺ channels: II. The components of gating currents and a model of channel activation." Biophys J **66**(4): 1011-1021.

Cha, A. and F. Bezanilla (1997). "Characterizing voltage-dependent conformational changes in the Shaker K⁺ channel with fluorescence." Neuron **19**(5): 1127-1140.

Cha, A. and F. Bezanilla (1998). "Structural implications of fluorescence quenching in the Shaker K⁺ channel." J Gen Physiol **112**(4): 391-408.

Chen, F. S., D. Steele, et al. (1997). "Allosteric effects of permeating cations on gating currents during K⁺ channel deactivation." J Gen Physiol **110**(2): 87-100.

Chen, J. (2001). "The S4-S5 linker couples voltage sensing and activation of pacemaker channels." Proceedings of the National Academy of Sciences **98**(20): 11277-11282.

Chen, J., J. S. Mitcheson, et al. (2001). "The S4-S5 linker couples voltage sensing and activation of pacemaker channels." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **98**(20): 11277-11282.

Coquiere, D., A. de la Lande, et al. (2009). "Multipoint molecular recognition within a calix[6]arene funnel complex." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **106**(26): 10449-10454.

Decher, N., J. Chen, et al. (2004). "Voltage-dependent gating of hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated pacemaker channels: molecular coupling between the S4-S5 and C-linkers." J.Biol.Chem. **279**(14): 13859-13865.

del Camino, D. (2005). "Status of the Intracellular Gate in the Activated-not-open State of Shaker K⁺ Channels." The Journal of General Physiology **126**(5): 419-428.

Ding, S. and R. Horn (2003). "Effect of S6 tail mutations on charge movement in Shaker potassium channels." Biophys J **84**(1): 295-305.

Hackos, D. H., T. H. Chang, et al. (2002). "Scanning the intracellular S6 activation gate in the shaker K⁺ channel." J Gen Physiol **119**(6): 521-532.

Hoshi, T., W. N. Zagotta, et al. (1990). "Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation." Science **250**(4980): 533-538.

Hoshi, T., W. N. Zagotta, et al. (1994). "Shaker potassium channel gating. I: Transitions near the open state." J Gen Physiol **103**(2): 249-278.

Imbrici, P., M. C. D'Adamo, et al. (2006). "Episodic ataxia type 1 mutations in the KCNA1 gene impair the fast inactivation properties of the human potassium channels Kv1.4-1.1/Kvbeta1.1 and Kv1.4-1.1/Kvbeta1.2." Eur J Neurosci **24**(11): 3073-3083.

Kanevsky, M. and R. W. Aldrich (1999). "Determinants of voltage-dependent gating and open-state stability in the S5 segment of Shaker potassium channels." J Gen Physiol **114**(2): 215-242.

Labro, A. J., A. L. Raes, et al. (2008). "Kv channel gating requires a compatible S4-S5 linker and bottom part of S6, constrained by non-interacting residues." J.Gen.Physiol **132**(6): 667-680.

Ledwell, J. L. and R. W. Aldrich (1999). "Mutations in the S4 region isolate the final voltage-dependent cooperative step in potassium channel activation." J.Gen.Physiol **113**(3): 389-414.

Loboda, A. and C. M. Armstrong (2001). "Resolving the gating charge movement associated with late transitions in K channel activation." Biophys J **81**(2): 905-916.

Long, S. B. (2005). "Crystal Structure of a Mammalian Voltage-Dependent Shaker Family K⁺ Channel." Science **309**(5736): 897-903.

Long, S. B. (2005). "Voltage Sensor of Kv1.2: Structural Basis of Electromechanical Coupling." Science **309**(5736): 903-908.

Long, S. B., E. B. Campbell, et al. (2005). "Voltage Sensor of Kv1.2: Structural Basis of Electromechanical Coupling." Science.

Lu, Z., A. M. Klem, et al. (2001). "Ion conduction pore is conserved among potassium channels." Nature **413**(6858): 809-813.

Lu, Z., A. M. Klem, et al. (2002). "Coupling between voltage sensors and activation gate in voltage-gated K⁺ channels." J.Gen.Physiol **120**(5): 663-676.

Mannuzzu, L. M., M. M. Moronne, et al. (1996). "Direct physical measure of conformational rearrangement underlying potassium channel gating." Science **271**(5246): 213-216.

McCormack, K., W. J. Joiner, et al. (1994). "A characterization of the activating structural rearrangements in voltage-dependent Shaker K⁺ channels." Neuron **12**(2): 301-315.

Ogielska, E. M., W. N. Zagotta, et al. (1995). "Cooperative subunit interactions in C-type inactivation of K channels." Biophys J **69**(6): 2449-2457.

Okumura, A., M. Sano, et al. (2007). "Aromatic structure of tyrosine-92 in the extrinsic PsbU protein of red algal photosystem II is important for its functioning." FEBS Lett **581**(27): 5255-5258.

Pathak, M. (2004). "The Cooperative Voltage Sensor Motion that Gates a Potassium Channel." The Journal of General Physiology **125**(1): 57-69.

Pathak, M., L. Kurtz, et al. (2005). "The cooperative voltage sensor motion that gates a potassium channel." J Gen Physiol **125**(1): 57-69.

Perozo, E., R. MacKinnon, et al. (1993). "Gating currents from a nonconducting mutant reveal open-closed conformations in Shaker K⁺ channels." Neuron **11**(2): 353-358.

Schoppa, N. E. and F. J. Sigworth (1998). "Activation of Shaker potassium channels. III. An activation gating model for wild-type and V2 mutant channels." J Gen Physiol **111**(2): 313-342.

Sigg, D., H. Qian, et al. (1999). "Kramers' diffusion theory applied to gating kinetics of voltage-dependent ion channels." Biophys J **76**(2): 782-803.

Slesinger, P. A., Y. N. Jan, et al. (1993). "The S4-S5 loop contributes to the ion-selective pore of potassium channels." Neuron **11**(4): 739-749.

Soler-Llavina, G. J., T. H. Chang, et al. (2006). "Functional interactions at the interface between voltage-sensing and pore domains in the Shaker K(v) channel." Neuron **52**(4): 623-634.

Starkus, J. G., L. Kuschel, et al. (1997). "Ion conduction through C-type inactivated Shaker channels." J Gen Physiol **110**(5): 539-550.

Starkus, J. G., L. Kuschel, et al. (1998). "Macroscopic Na⁺ currents in the "Nonconducting" Shaker potassium channel mutant W434F." J Gen Physiol **112**(1): 85-93.

Stefani, E., L. Toro, et al. (1994). "Gating of Shaker K⁺ channels: I. Ionic and gating currents." Biophys J **66**(4): 996-1010.

Tagliatalata, M., L. Toro, et al. (1992). "Novel voltage clamp to record small, fast currents from ion channels expressed in *Xenopus* oocytes." Biophys.J. **61**(1): 78-82.

Tristani-Firouzi, M., J. Chen, et al. (2002). "Interactions between S4-S5 linker and S6 transmembrane domain modulate gating of HERG K⁺ channels." J.Biol.Chem. **277**(21): 18994-19000.

Tytgat, J. and P. Hess (1992). "Evidence for cooperative interactions in potassium channel gating." Nature **359**(6394): 420-423.

Varga, Z., M. D. Rayner, et al. (2002). "Cations affect the rate of gating charge recovery in wild-type and W434F Shaker channels through a variety of mechanisms." J Gen Physiol **119**(5): 467-485.

Yang, Y., Y. Yan, et al. (1997). "How does the W434F mutation block current in Shaker potassium channels?" J Gen Physiol **109**(6): 779-789.

Zagotta, W. N. and R. W. Aldrich (1990). "Alterations in activation gating of single Shaker A-type potassium channels by the Sh5 mutation." J Neurosci **10**(6): 1799-1810.

Zagotta, W. N. and R. W. Aldrich (1990). "Voltage-dependent gating of Shaker A-type potassium channels in *Drosophila* muscle." J Gen Physiol **95**(1): 29-60.

Zagotta, W. N., T. Hoshi, et al. (1990). "Restoration of inactivation in mutants of Shaker potassium channels by a peptide derived from ShB." Science **250**(4980): 568-571.

Zagotta, W. N., T. Hoshi, et al. (1994). "Shaker potassium channel gating. III: Evaluation of kinetic models for activation." J Gen Physiol **103**(2): 321-362.

3.2. Article 2

Mode shift of the voltage sensors in Shaker K^+ channels is caused by energetic coupling to the pore domain

Georges A. Haddad and Rikard Blunck

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

3.2.1. Abstract

The voltage sensors of voltage-gated ion channels undergo a conformational change upon depolarization of the membrane that leads to pore opening. This conformational change can be measured as gating currents and is thought to be transferred to the pore domain via an annealing of the covalent link between voltage sensor and pore (S4-S5 linker) and the C-terminus of the pore domain (S6). Upon prolonged depolarizations, the voltage-dependence of the charge movement shifts to more hyperpolarized potentials. This “mode shift” had been linked to C-type inactivation but has recently been suggested to be caused by a relaxation of the voltage sensor itself. Here, we identified two ShakerIR mutations in the S4-S5 linker (I384N) and S6 (F484G) which, when mutated, completely uncouple voltage sensor movement from pore opening. Using these mutants, we show that the pore transfers energy onto the voltage sensor and that uncoupling the pore from the voltage sensor leads the voltage sensors to be activated at more negative potentials. This uncoupling also eliminates the mode shift occurring during prolonged depolarizations, indicating that the pore influences entry into the mode shift. Using voltage-clamp fluorometry, we identified that the slow conformational change of the S4 previously correlated with the mode shift, disappears when uncoupling the pore. The effects can be explained by a "mechanical load" that is imposed upon the voltage sensors by the pore domain, and allosterically modulates its conformation. Mode shift is caused by the stabilization of the open state but leads to a conformational change in the voltage sensor.

KEYWORDS: Voltage-gated K⁺ channel, gating, gating currents, electromechanical coupling, mode-shift, voltage-clamp fluorometry

3.2.2. Introduction

In the gating mechanism of the voltage-gated ion channels, a depolarization of the membrane prompts voltage sensors (transmembrane helices S1-S4) to undergo conformational changes, which then trigger the central ion conducting pore (transmembrane helices S5-S6) to open. The conformational changes of the voltage sensor are manifested as gating currents, small transient currents caused by the movement of the positively charged arginines of the fourth transmembrane domain S4 through the electric field. After prolonged depolarization more positive than -60 mV, the voltage sensors require stronger hyperpolarizations to return to their resting position than the voltage required to move the voltage sensors to the activated state. As a consequence, the voltage dependence of the gating charges Q that are moved upon polarization to varying voltages V (QV) shifts to more negative potentials compared to the QV obtained when holding the resting potential at -90 mV. This behaviour is referred to as “mode-shift”.

The occurrence of the mode-shift in voltage-dependent ion channels is well-documented. It was first observed in QV s from squid axons (Bezanilla, Taylor et al. 1982) and was later also described for potassium channels (Fedida, Bouchard et al. 1996; Olcese, Latorre et al. 1997; Olcese, Sigg et al. 2001; Piper, Varghese et al. 2003), sodium channels (Bezanilla, Taylor et al. 1982; Kuzmenkin, Bezanilla et al. 2004), hyperpolarization-activated cyclic-nucleotide-gated (HCN) channels (Mannikko, Pandey et al. 2005; Bruening-Wright and Larsson 2007) and calcium channels (Brum and Rios 1987; Shirokov, Levis et al. 1992).

In HCN channels, the mode shift is more distinct (Mannikko, Pandey et al. 2005; Bruening-Wright, Elinder et al. 2007; Bruening-Wright and Larsson 2007) and is required for a stable rhythmic firing of pacemaker cells. The physiological role of the mode-shift in the voltage-gated K^+ channel Shaker from *Drosophila* and its human homologues the Kv1 channels, however, is not yet fully understood. It is likely that the mode-shift ensures rapid repolarization to the resting potential, as the Kv1 channels are responsible for the repolarization of the membrane after an exciting potential and protect

against too fast reactivation (Geiger and Jonas 2000; Sutachan, Watanabe et al. 2005). The channels start to open around -50 mV after the onset of an action potential, and without an additional mechanism, the forward and backward movement of gating charges should occur at the identical potentials. The mode-shift of the QV, however, makes certain that the Kv channels do not close or recover from inactivation (see below) before the resting potential of -70 mV has been reached again thus preventing too early closure and too rapid firing, respectively. At the resting potential the channels are thus closed under steady state conditions, but are open (or inactivated) after a prolonged excitation in order to readjust the resting potential.

The mode shift has been correlated with slow C-type inactivation. In contrast to N-type inactivation, which is caused by the N-terminal ball peptide blocking the pore from the cytosolic entry (Bezanilla and Armstrong 1977; Hoshi, Zagotta et al. 1990; Zagotta, Hoshi et al. 1990), in C-type inactivation, the selectivity filter itself enters a non-conductive conformation (Ehrenstein and Gilbert 1966; Choi, Aldrich et al. 1991; Hoshi, Zagotta et al. 1991; Yellen, Sodickson et al. 1994; Blunck, Cordero-Morales et al. 2006; Cordero-Morales, Cuello et al. 2006; Cuello, Jogini et al. 2010; Cuello, Jogini et al. 2010). The time course of developing the mode shift has been shown to coincide with the time course of entering the inactivated state (Olcese, Latorre et al. 1997). It has also been observed in the ShakerIR-T449V-I470C mutant (Holmgren, Smith et al. 1997) that is thought to enter into a conducting state with a conformation similar to that of C-type inactivation. However, also a non-inactivating mutant of the HERG channel shifts the QV (Piper, Varghese et al. 2003), as well as the non-inactivating HCN channels (Mannikko, Pandey et al. 2005; Bruening-Wright, Elinder et al. 2007; Bruening-Wright and Larsson 2007), indicating that, although C-type inactivation is correlated with the mode shift, inactivation is not a prerequisite for the shift.

A recent discovery of the mode shift of the QV even in voltage-dependent phosphatases of *C. intestinalis* (Ci-VSP; Murata, Iwasaki et al. 2005) has led to the suggestion that the shift is an intrinsic property of the voltage sensor, caused by a “relaxation” of the S4 from a 3_{10} to an α -helical conformation (Villalba-Galea, Sandtner et al. 2008). Ci-VSP consist of the voltage sensor domain (S1-S4) linked to a phosphatase whose activity is

governed by the membrane potential. Thus, it does not contain a pore domain and no C-type inactivation may be defined for this protein. An influence of the pore domain is, therefore, unlikely, unless it is replaced by the enzymatic domain. In addition, the shift is still observed in the isolated voltage sensor of Ci-VSP after truncation of the enzymatic domain (Villalba-Galea, Sandtner et al. 2008). Findings by Bruening-Wright et al. (Bruening-Wright and Larsson 2007) support that the mode shift occurs in the S4. They identified a slow conformational change in the S4 of HCN channels that coincides with the shift from one mode to the other. A similar conformational change has been found in the fluorescence signal of Ci-VSP (Villalba-Galea, Sandtner et al. 2008).

To resolve the apparent contradiction between the dependence of the mode shift on the state of the pore and its occurrence in an isolated voltage sensor, we investigated the influence of the coupling between pore domain and voltage sensor (electromechanical coupling) on the development of the mode shift. The molecular determinants underlying the electromechanical coupling between the voltage sensor movement and opening of the pore in voltage-gated ion channels has been narrowed down to an interaction between the S4-S5 linker, the only covalent link between voltage sensor and pore, and the C-terminal end of the S6 either of the same (Chen, Mitcheson et al. 2001; Lu, Klem et al. 2001; Lu, Klem et al. 2002; Tristani-Firouzi, Chen et al. 2002; Decher, Chen et al. 2004; Long, Campbell et al. 2005; Labro, Raes et al. 2008; Muroi, Arcisio-Miranda et al. 2010) or the neighboring subunit (Batulan, Haddad et al. 2010). The annealing between the S4-S5 linker and the S6 is one of a number of close contacts in the tertiary and quaternary structure observed in the crystal structure of the human homologue to Shaker Kv1.2 (Long, Campbell et al. 2005).

In this study, we utilized mutations that fully uncouple the voltage sensor movement from pore opening in order to investigate to what extent the pore domain influences the conformation of the voltage sensor.

3.2.3. Materials and Methods

Experiments for this study were obtained using the ShakerIR-H4 channel, in which N-type inactivation was removed by deletion ($\Delta 6-46$) (Hoshi, Zagotta et al. 1990). We also used the non-conducting Shaker-H4- $\Delta(6-46)$ -W434F (Perozo, MacKinnon et al. 1993) for gating current measurements. For simultaneous fluorescence measurements, the mutation A359C was introduced. Point mutations were generated using site-directed mutagenesis (QuikChange; Stratagene) and sequences were verified in a sequencing facility. Oocytes from *Xenopus laevis* were surgically obtained. Follicular membrane was removed according to a standard collagenase treatment. cRNA was in vitro transcribed (mMachine T7, Ambion) and 46 nl injected into each oocyte with concentrations of 0.1 - 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. After injection, oocytes were incubated in Barth solution at 18°C for 1-3 days before electrophysiological recordings.

Measurements were performed with the cut-open voltage clamp fluorometry technique for spatial voltage homogeneity and fast temporal resolution (Tagliatela, Toro et al. 1992; Cha and Bezanilla 1997; Batulan, Haddad et al. 2010). Macroscopic currents were recorded and registered using “GPatch” acquisition software (UCLA, Dept. of Anesthesiology). Oocytes were placed in a 3-part chamber; top, middle, bottom, containing an external solution (115 mM N-methyl-D-glucamine (NMDG), 10 mM HEPES, 2 mM $\text{Ca}(\text{OH})_2$) adjusted to pH 7.1 using MES, then permeabilized by exchanging external solution in the bottom chamber with 0.2% saponin so the current could be injected directly into the oocyte. Saponin is replaced by an internal solution (10 mM HEPES, 2 mM EDTA, 115 mM NMDG [for gating current recording] or KOH [for ionic current recording]) adjusted to pH 7.1 using MES. The voltage electrode was filled with 3 M KCl. Recordings were done at room temperature.

Capacitive current was subtracted from the current traces with the P/4 protocol. For gating currents oocytes were held at -90 mV, -120 mV (I384C) or -140 mV (I384A) with pulse potential starting from -120 mV ranging to +50 mV and +180 mV in 10 mV increments. Gating and ionic current were analyzed with “Analysis” software (UCLA, Dept. of Anesthesiology).

The total gating charge was calculated by integrating the gating current as a function of time. The relation between the gating charge (Q) as a function of voltage (V) was fit, using commercial software, to a single Boltzmann equation $Q/Q_{\max} = (1 + \exp(-(V - V_{1/2})/dV))^{-1}$, with dV being the slope factor and $V_{1/2}$ the potential with $Q/Q_{\max} = 0.5$. Correspondingly, the conductance (G) as a function of voltage (V) was fit to $G/G_{\max} = (1 + \exp(-(V - V_{1/2})/dV))^{-1}$, with dV being the slope factor and $V_{1/2}$ the potential with $G/G_{\max} = 0.5$. Significance of shifts between QV or GV relations was determined by 1-way ANOVA.

3.2.4. Results

3.2.4.1. Shaker mutations I384N and F484G uncouple the voltage sensor movement from pore opening

Our first goal was to identify mutations that fully uncouple the pore movement from the voltage sensors in the coupling region of the Shaker K^+ channel but not inside the voltage sensor or charge transfer center. Mutations in the lower S4 (Smith-Maxwell, Ledwell et al. 1998; Ledwell and Aldrich 1999; Silverman, Roux et al. 2003; Tao, Lee et al. 2010) tend to change the intrinsic transitions and properties of the voltage sensor itself, and, thus, cannot be used to conclusively determine the effect of the coupling between the voltage sensor and the pore. The energy generated by the voltage sensor has been suggested to be transferred to the pore domain by a link between the S4-S5 linker and the C-terminus of the S6 beyond the PVP-kink. We thus looked in the crystal structure of the human homologue of Shaker, Kv1.2, for possible candidates in that region to fully uncouple voltage sensor and pore within one subunit. We found, as the most likely interaction partners, the isoleucine I384 on the N-terminal S4-S5 linker and the two phenylalanines F481 and F484 on the S6 (Fig. 3.2.1.a). The corresponding residue in Kv1.5, I422 forms together with F519 and F522 a hydrophobic contact to promote voltage sensor-pore coupling (Labro, Raes et al. 2008). In Shaker, according to the interacting regions found in the crystal structure of Kv1.2, I384 seems to fit snugly into a hydrophobic pocket formed by the two phenylalanines F481 and F484. All three

residues I384, F481 and F484 are close to the regions identified by Lu et al. (Lu, Klem et al. 2001; Lu, Klem et al. 2002) as important for electromechanical coupling in Kv channels. F481 and F484 are located within the region N480-Y485 whereas I384 is positioned one residue before the interacting region L385-S392 on the S4-S5 linker.

In order to achieve uncoupling, the isoleucine I384 and the two phenylalanines F481 and F484 were, then, mutated in the ShakerIR-W434F background to an asparagine (I384N) and glycines (F481G and F484G), respectively. Compared with isoleucines, asparagines have a similar size but are more hydrophilic, and thus likely disturb the suspected hydrophobic interaction. The phenylalanines, on the other hand, were replaced with smaller-sized glycines in order to remove their aromatic ring that reaches, like a lever, deep into the contact area. Out of the three mutants I384N-W434F, F481G-W434F, and F484G-W434F, we were able to obtain gating currents only from the two mutants, ShakerIR-W434F-I384N and -F484G (Fig. 3.2.1.b).

The analysis of the gating currents revealed that the QV – the relation between integrated gating charge versus depolarization potential – of both mutants was shifted to more negative potentials ($V_{1/2} = -68.5 \pm 0.6$ mV and -67.7 ± 0.6 mV for I384N and F484G, respectively; Fig. 3.2.1.c, Table III.II.I), indicating that the voltage sensor requires less energy to transit to the activated state or, depending on the perspective, more energy to return to the resting state. When we determined the voltage dependence of the pore opening in the corresponding conducting ShakerIR-A359C mutants (Fig. 3.2.1.d), we found that the conductance voltage relation (GV) of I384N and F484G were, in contrast to the QVs, far shifted to positive potentials (Fig. 3.2.1.d). For pulses up to +200 mV, the conductance did not even saturate. We, thus, could not define a $V_{1/2}$ of these mutants.

The amplitude of the ionic currents was significantly lower than generally observed in other mutants. This might, of course, simply be due to lower expression efficiency but could also result from very low open probability, and indeed, for I384N, we were able to measure gating and ionic currents simultaneously, confirming a low open probability (Fig. 3.2.2.a). From their respective amplitudes, we calculated the open probability.

Under the assumption that in this mutant as in wildtype Shaker, during the activation of each channel, 13 e^- are moved through the electric field, we can determine the number of channels present in the clamped membrane from the total gating charge measured for a saturating depolarizing pulse. Assuming a conductance of 11 pS (Lopez, Jan et al. 1994), we can also determine how many channels are open at +195 mV. From both results, we deduced that only approx. 0.8% of the channels present were open at +195 mV.

The drastic separation between QV and GV indicates that in the mutants I384N and F484G, the voltage sensor movement is no longer energetically coupled to pore opening, because the range in which the voltage sensor movement occurred (<-10 mV) hardly overlaps with the range in which the pore opens. The latter only begins at -20 mV to 0 mV for I384N and F484G, respectively, and does not saturate at potentials more negative than 200 mV. As the conductance still increases significantly although the charge movement is already saturated, it follows that voltage sensor activation does not lead directly to pore opening anymore. If the energetic coupling would have remained the same and only one transition would have been changed, both QV and GV would have been shifted in the same direction.

To confirm that the mutants energetically uncouple the voltage sensor from the pore also in the conducting mutant, we compared the fluorescence voltage relationships (FV) of the conducting ShakerIR-A359C-I384N and -F484G mutants to their GVs obtained simultaneously. We, first, labeled the cysteine in the S3-S4 linker at position A359C with tetramethyl-rhodamine maleimide (TMRM) such that fluorescence intensity reports the state of the voltage sensor (Mannuzzu, Moronne et al. 1996; Cha and Bezanilla 1997; Batulan, Haddad et al. 2010). Simultaneous monitoring of the gating (FV) and conductance (GV) of ShakerIR-A359C, -I384N and -F484G revealed that in the uncoupled mutants, the FV, like the QVs obtained earlier from the non-conducting mutants, shifted to more negative potentials (Fig. 3.2.1.d), while the GV of -I384N and -F484G, like above, shifted to the more positive potentials so that also here no overlap between QV (FV) and GV is observed. These results confirm in simultaneous measurements of charge movement and pore opening that both processes occur

energetically uncoupled.

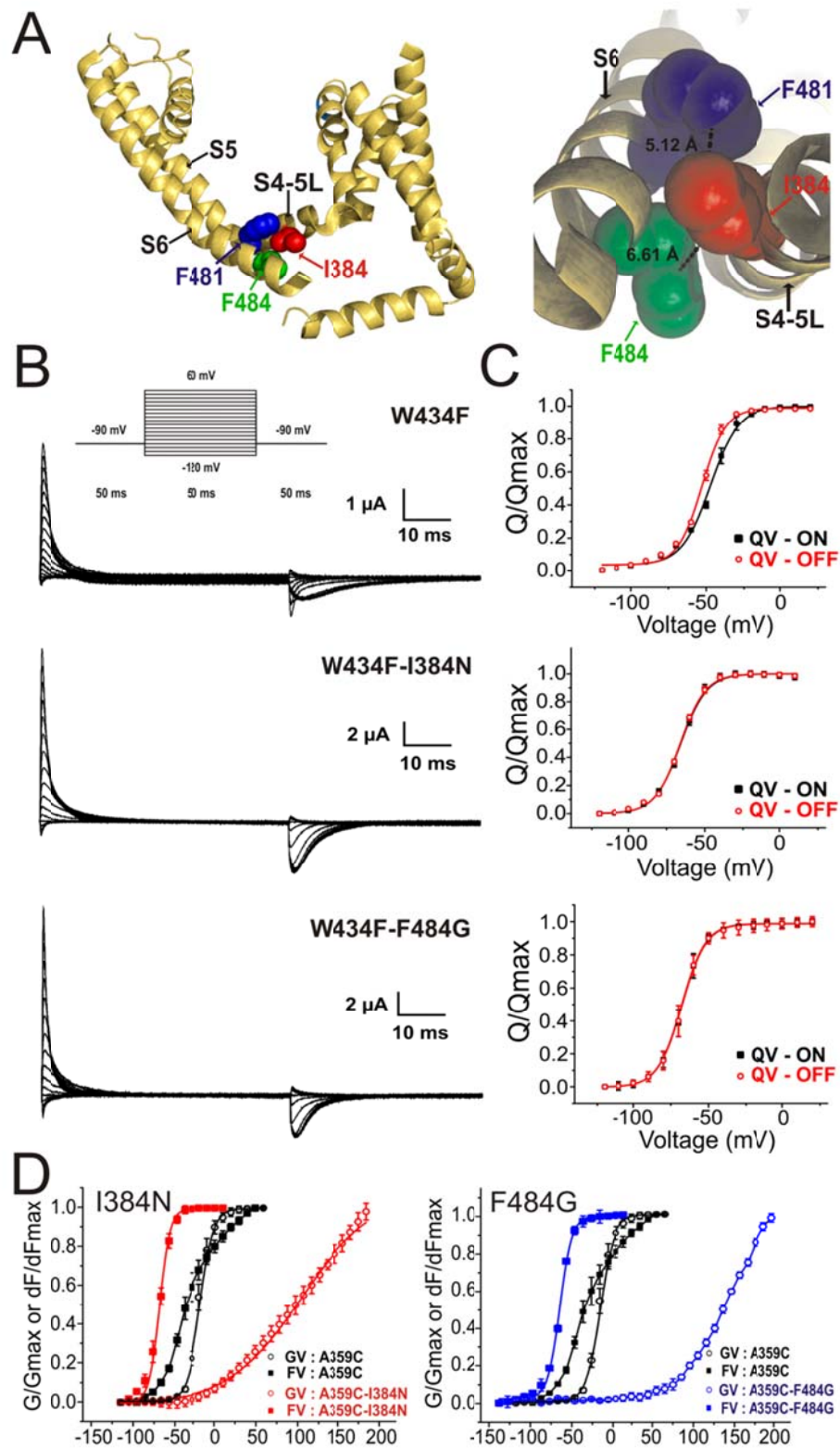


Figure 3.2.1. Uncoupling mutants I384N and F484G.

(a) Location of the uncoupled mutants in the Kv1.2 crystal structure (Long, Campbell et al. 2005). Shown is a single subunit. I384 is located on the S4-S5 linker, F481 and F484 are located on the C-terminal S6,

which anneals to the S4-S5 linker. (*right*) magnification of interaction site. (b) Gating currents of ShakerIR-W434F, -I384N and -F484G in response to a series of depolarizing pulses from a holding potential of $V_{\text{hold}} = -90$ mV to a potential of -120 mV to 60 mV in steps of 10 mV for 50 ms. (c) QV_{ON} (*black*) and QV_{OFF} (*red*) of ShakerIR-W434F, -I384N and -F484G. Data are shown as mean \pm SD. (d) Gating charge voltage (QV, squares) and conductance voltage (GV, circles) relations for ShakerIR-A359C (*black*), -I384N (*red*) and -F484G (*blue*) elicited from a series of depolarizing pulses from a holding potential of $V_{\text{hold}} = -90$ mV to a potential of -120 mV to 60 mV/200 mV in steps of 10 mV for a duration of 50 ms. QV and GV are far separated in the uncoupled mutants I384N and F484G. Data are shown as mean \pm SD.

TABLE I
Summary of results of Boltzmann fits to the QVs and GVs of the mutant channels

Mutation	$QV_{90\text{ON}}$ (W434F)		QV_{OFF} (W434F)		QV_0 (W434F)		W434F (n)	GV (A359C)		FV_{90} (A359C)		FV_0 (A359C)		A359C (n)
	$V_{1/2}$	dV	$V_{1/2}$	dV	$V_{1/2}$	dV		$V_{1/2}$	dV	$V_{1/2}$	dV	$V_{1/2}$	dV	
	mV	mV	mV	mV	mV	mV		mV	mV	mV	mV	mV	mV	
ShakerIR	-49.2 \pm 0.7	8.5 \pm 0.4	-53.0 \pm 0.3	7.6 \pm 0.3	-74.4 \pm 0.5	9.0 \pm 0.1	22	-22.5 \pm 0.2	6.3 \pm 0.4	-47.1 \pm 0.5	14.6 \pm 0.6	-115.3 \pm 9.2	14.9 \pm 0.4	11
I384N	-68.5 \pm 0.6	8.0 \pm 0.3	-69.8 \pm 0.3	8.3 \pm 0.3	-69.2 \pm 0.2	7.9 \pm 0.2	10			-71.6 \pm 1.1	10.7 \pm 0.8	-72.5 \pm 0.8	13.4 \pm 0.1	8
F484G	-67.7 \pm 0.6	8.0 \pm 0.2	-68.0 \pm 0.3	8.0 \pm 0.3	-71.6 \pm 0.3	7.1 \pm 0.2	6			-70.3 \pm 0.7	10.6 \pm 0.2	-70.9 \pm 1.1	14.3 \pm 0.6	5
Y485A	-48.5 \pm 0.4	10.9 \pm 0.3	-49.1 \pm 0.3	11.6 \pm 0.2	-55.1 \pm 0.8	13.4 \pm 0.7	5							
I384A*	-34.6 \pm 0.1	13.2 \pm 0.9	-36.6 \pm 0.1	15.2 \pm 1.0	-106.5 \pm 0.4	9.0 \pm 0.3	4	-32.6 \pm 0.2	6.6 \pm 0.2					6
I384A	-37.8 \pm 0.4	12.9 \pm 0.4			-106.5 \pm 0.4	9.0 \pm 0.3	5	-34.7 \pm 0.4	6.6 \pm 0.2	-39.2 \pm 1.2	11.3 \pm 1.4	-145 \pm 5.4	11.3 \pm 1.2	6
F484A	-58.5 \pm 0.5	8.5 \pm 0.3	-61.0 \pm 0.6	11.7 \pm 0.5	-63.8 \pm 0.2	9.4 \pm 0.4	5	-29.2 \pm 0.6	8.3 \pm 0.6					5
I384C*	-48.9 \pm 0.5	11.5 \pm 0.9	-53.0 \pm 0.3	13.6 \pm 0.7	-114.3 \pm 0.8	9.3 \pm 0.3	4	-37.9 \pm 0.6	7.5 \pm 0.4					4

Table III.II.I. Summary of results of Boltzmann fits to the QVs and GVs of the mutant channels.

$V_{1/2}$, \pm SD, and dV (see materials and methods) of single Boltzmann fits of QV_{90} , QV_{OFF} , QV_0 , GV, FV_{90} and FV_0 are given for ShakerIR wildtype and the mutants I384N, F484G, Y485A, I384A, F484A and I384C. The secondary mutation (W434F or A359C) is given on top of each column. (*) The GV and QV_{90} values (QV_{ON} and QV_{OFF}) of I384A* and I384C* are obtained from holding potentials of $V_{\text{hold}} = -140$ mV and -120 mV, respectively, due to the strongly shifted QV_{OFF} . QV_{90} and QV_{140} of I384A are not significantly displaced with respect to one another. The N given in the table III.II.I indicates the number of fully independent measurements (different batch of oocytes).

3.2.4.2. Uncoupled mutants show a slow off-gating component

The gating currents obtained from uncoupled mutants were faster than those obtained from ShakerIR-W434F – perhaps an expected result from uncoupled mutants that extricate the pore from the workings of the voltage sensors and thus energetically free the voltage sensors (Fig. 3.2.1.b, Fig. 3.2.2.b). What was unexpected, however, was that the off-gating currents show a slow onset and decay (Fig. 3.2.1.b), seemingly contrary to the current understanding that the slow component observed in W434F is caused by an

open state stabilization (Batulan, Haddad et al. 2010). The onset disappears from the gating currents obtained from depolarizing pulses to voltages where the pore does not open (Perozo, MacKinnon et al. 1993; McCormack, Joiner et al. 1994; Chen, Steele et al. 1997). In our uncoupled mutants, however, a slow onset before the exponential decay is observed in spite of the pore being closed. The shape of the off-gating currents did not change even upon depolarizations up to potentials of +180 mV, at which the channels opened partly. In this range, also no further charge movement was observed.

A slow onset in the gating currents can be observed only if the voltage sensors are stabilized in the activated state, and leaving the stabilized state should be the rate limiting step upon return to the resting state. However, whereas in ShakerIR-W434F, the slow component only develops if the pore is open during open state stabilization (Perozo, MacKinnon et al. 1993; McCormack, Joiner et al. 1994; Batulan, Haddad et al. 2010), here, a slow component develops that is not seen in the closed ShakerIR-W434F, the activated-not-open ILT-mutant (Ledwell and Aldrich 1999) or the open-state-stabilization deficient mutant -Y485A. The stabilization of the voltage sensor in the uncoupled mutants, thus, has a different origin than the open state stabilization observed in ShakerIR-W434F.

3.2.4.3. Uncoupling removes the shift between on and off-gating

One feature in the QVs of I384N and F484G that caught our attention was the missing shift between the QV_{ON} and QV_{OFF} , which are obtained at the beginning and the end of the pulse, respectively (Fig. 3.2.1.c). In theory, all gating charges that become activated during a depolarizing pulse should return to their resting position when “resetting” the channel to the initial state. Thus, plotting the gating charge that moved during the onset of a depolarizing pulse (Q_{ON}) and the one that moved during the return to resting potential (Q_{OFF}) as a function of the pulse potential (V) should lead to identical curves. In practice, however, the charges return too slowly to resolve their gating current over the current noise, and consequently, Q_{OFF} is smaller than Q_{ON} so that the QV_{OFF} shifts slightly left of the QV_{ON} after normalization (Fig. 3.2.1.c). This shift between the QV_{ON} and QV_{OFF} was notably absent in the QVs of the uncoupled mutants I384N and F484G.

The shift between the QV_{ON} and QV_{OFF} observed in W434F is likely also linked to the mode-shift, the shift of the QV which occurs during prolonged depolarizations (Bezanilla, White et al. 1982; Fedida, Bouchard et al. 1996; Olcese, Latorre et al. 1997). The reason is that the Q_{OFF} is obtained, in contrast to the Q_{ON} , *after* a depolarization of 50-100 ms, meaning that the channels will, at least partly, have entered the “shifted” mode. Because the QV_{ON} - QV_{OFF} shift is related to the mode shift, its absence in the uncoupled mutants suggests that also the mode shift will be influenced by uncoupling. The more robust effect of the mode shift motivated us to verify whether it is affected in the two uncoupled mutants.

Pulsing to more hyperpolarized potentials from a holding potential of $V_{hold} = 0$ mV, we determined the QV_0 of ShakerIR-W434F and confirmed that it had shifted to more negative potentials with respect to the QV_{90} obtained at $V_{hold} = -90$ mV (-73.4 ± 0.4 mV at $V_{hold} = 0$ mV versus -49.2 ± 0.7 mV at $V_{hold} = -90$ mV; Fig. 3.2.2.c). It suggests that after the pore has opened, the return path is energetically altered and more energy is required to deactivate the voltage sensors. This behaviour has been modeled with a parallel return path previously (Bezanilla, Taylor et al. 1982; Bezanilla, Perozo et al. 1994; Olcese, Latorre et al. 1997; Villalba-Galea, Sandtner et al. 2008).

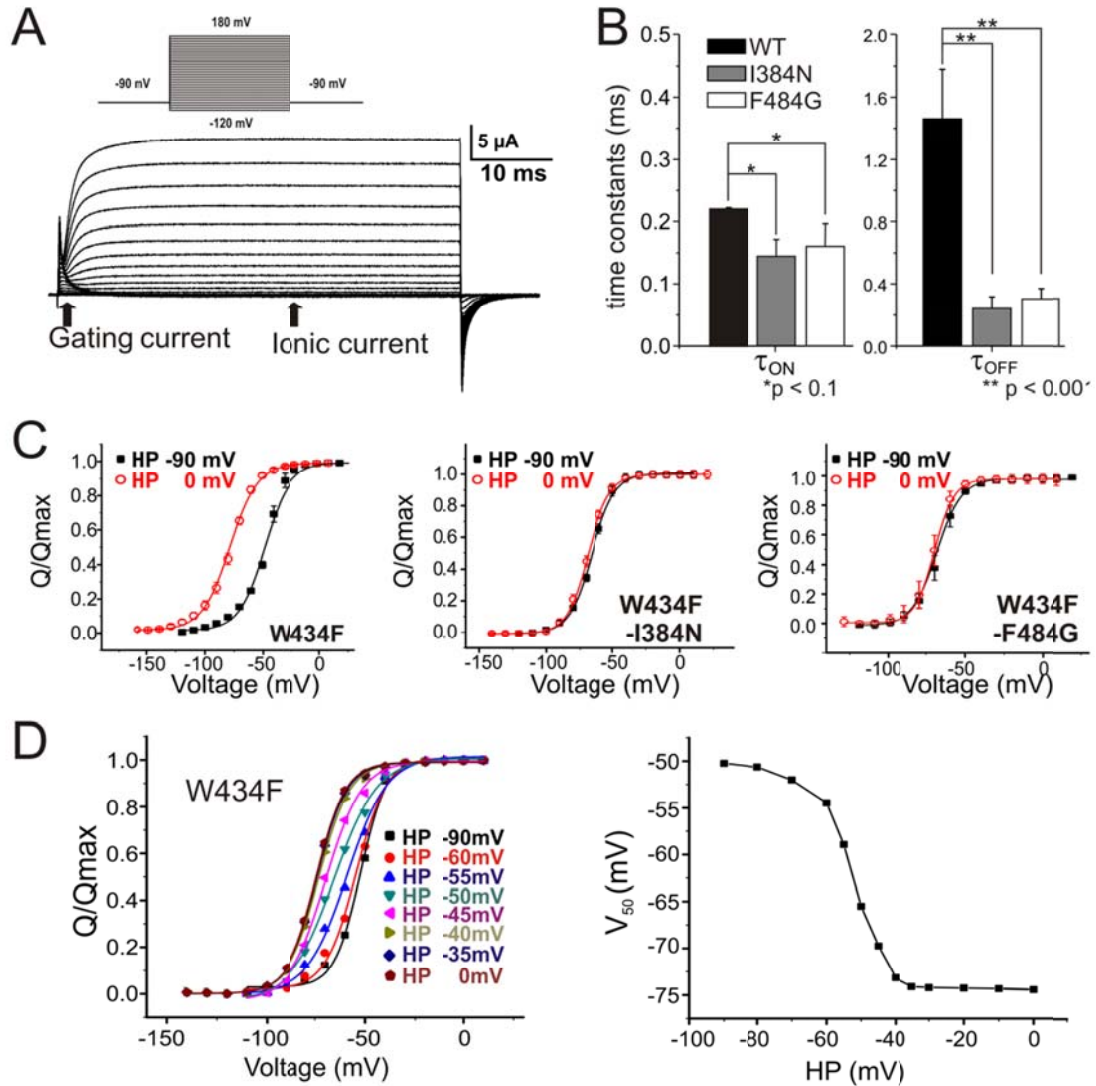


Figure 3.2.2. Mode shift is removed in uncoupled mutants I384N and F484G.

(a) Gating and ionic currents in response to a series of depolarizing pulses from a holding potential of $V_{\text{hold}} = -90$ mV to a potential of -120 mV to 180 mV in steps of 10 mV elicited from ShakerIR-I384N. Both gating currents and ionic currents are detectable. (b) Time constants from exponential fits of the gating currents (saturating depolarizations) obtained from W434F ($N = 7$), I384N ($N = 6$) and F484G ($N = 4$). Data is given as mean \pm SD. (c) QV curves were elicited for holding potentials at -90 mV (QV_{90}) and at 0 mV (QV_0) of ShakerIR-W434F, I384N and F484G in response to a series of depolarizing pulses from -160 mV to $+60$ mV in steps of 10 mV. No shift of the QVs is observed in the uncoupled mutants ($p > 0.3$) but for W434F ($p < 0.0001$). Data are shown as mean \pm SD. (d) QV relations of ShakerIR-W434F in response to a series of pulses from a given holding potential (HP) to variable voltages. (*right*) V_{50} of single Boltzmann fits as a function of the holding potential of the data on *left*. The shift occurs at voltages between -60 mV and -40 mV. Data are shown as mean \pm SD.

Strikingly, when we repeated the above experiments obtained from ShakerIR-W434F with the -I384N and -F484G mutants, we found that the QV_0 remained largely unchanged ($V_{1/2} = -69.2 \pm 0.2$ mV and -71.6 ± 0.3 mV for I384N and F484G, respectively) and almost superposed with the left-shifted QV_{90} ($V_{1/2} = -68.5 \pm 0.4$ mV and -67.7 ± 0.6 mV for I384N and F484G, respectively). Uncoupling, thus, removed the mode-shift (Table III.II.I, Fig. 3.2.2.c), and only under the influence of the pore domain, do both shifts of QV_{OFF} and QV_0 with respect to QV_{90} (QV_{ON}) occur.

These effects may be interpreted by regarding the energy levels. A shift in the QV is associated to the difference in the free energy ΔG between the initial and final state. Relative to the ShakerIR-W434F QV_{90} obtained for depolarizations from -90 mV, we found two different shifts to more negative potentials, the shift of the QV_{90} of the uncoupled mutants as well as the mode shift, the shift of the QV_0 of ShakerIR-W434F. As the voltage sensors are in their resting position at negative membrane potentials, a negative shift of the QV translates into less energy required to activate the voltage sensors and vice versa. The negative shift of the QV_{90} in the uncoupled mutants indicates, thus, that activation of the sensors in the absence of pore opening requires less free energy. However, during longer depolarizations to 0 mV, the QV of both coupled and uncoupled mutants superpose (Fig. 3.2.2.c) because, while the QVs - and thus the energy levels - of the uncoupled mutants do not change, the wildtype channel's QV_0 is shifted to more negative potentials, indicating that more work is required to return the voltage sensors to their resting state (and less to activate them). Since only the wildtype channel and not the uncoupled mutants are affected by the prolonged depolarization and, additionally, both shifts, the shift in the QV_{90} due to uncoupling and the mode-shift of the wildtype channel, are of equal value, the question arises whether both shifts and their conjugated differences in free energy ($\Delta\Delta G$) have the same underlying mechanism.

Let us consider the effect of uncoupling first. Under the assumption that the uncoupling mutations did affect neither the intrinsic voltage sensor movement nor the properties of pore opening, the energy liberated by uncoupling the voltage sensor from the pore in I384N and F484G is, in the wildtype, required to overcome the mechanical “load” to open the pore. According to the actio = reactio principle, then, the pore “pushes” or

applies force against the sensor, thus, preventing it to activate at more negative potentials. If, as mentioned above, both shifts and their conjugated $\Delta\Delta G$'s have the same underlying mechanism, this would suggest that the mechanical "load" is taken off the voltage sensors during prolonged depolarizations to 0 mV in a process of "open pore stabilization", which would leave the voltage sensors in the same energetic state as the uncoupled mutants.

3.2.4.4. Shift is mediated during stabilization of the pore in the open state

To test whether our above hypothesis is true that the changes in ΔG upon both uncoupling and prolonged depolarizations are caused by the release of the mechanical load that the pore puts upon the voltage sensors, we verified whether blocking the open pore stabilization will suppress the mode shift – shift in the QV_0 with respect to QV_{90} – while leaving unchanged the QV_{90} of the wildtype channel. The most likely candidate for the stabilizing interaction is the open state stabilization that gives rise to the slow component in ShakerIR-W434F off-gating currents (Batulan, Haddad et al. 2010). An indication that open state stabilization influences the mode shift becomes evident when plotting the $V_{1/2}$ of the QV as a function of V_{hold} . The shift of the $V_{1/2}$ occurs in the voltage range between -70 mV to -40 mV (Fig. 3.2.2.d). In this range develops also the slow component in the off-gating current of Shaker-IR-W434F. Thus, open state stabilization and development of the mode-shift correlate with one another.

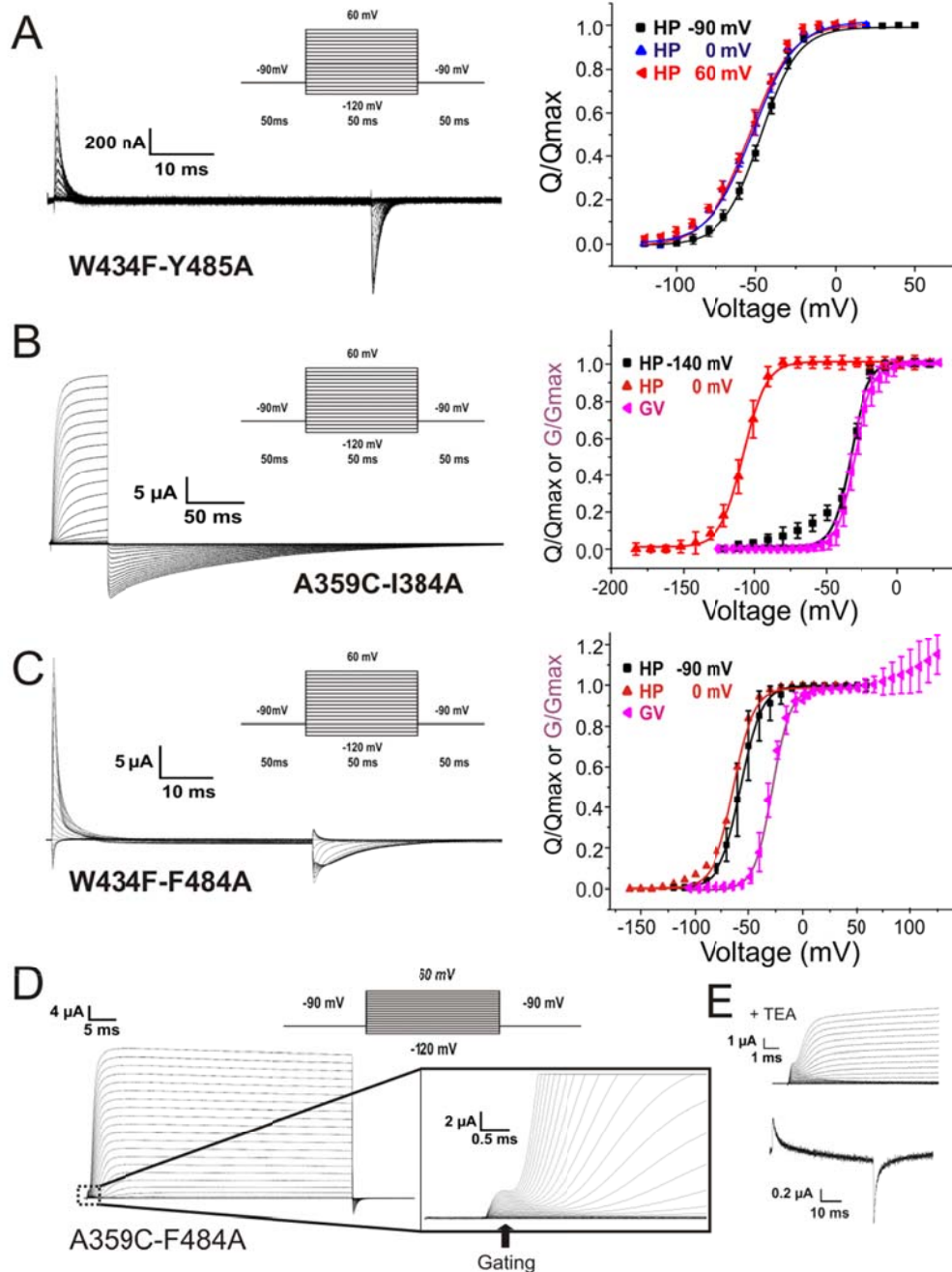


Figure 3.2.3. Open state stabilization, strong and weak coupling

(a) Gating currents of ShakerIR-W434F-Y485A in response to a series of depolarizing pulses (50 ms) from a holding potential of -90 mV to voltages between -120 mV and 60 mV in steps of 10 mV. (*right*) Corresponding QV relations for holding at +60 mV, 0 mV and -90 mV are shown. Only a very modest mode shift is observed ($p > 0.2$). Data are shown as mean \pm SD. (b) Ionic currents of ShakerIR-W434F-I384A in response to a series of depolarizing pulses (50 ms) from a holding potential of -90 mV to voltages between -120 mV and 60 mV in steps of 10 mV. On the *right* the corresponding QV relations for holding at 0 mV and -140 mV and the GV ($V_{\text{hold}} = -140$ mV) are shown. The QVs are significantly shifted ($p < 0.0001$). Data are shown as mean \pm SD. (c) Gating currents of ShakerIR-W434F-F484A in response

to a series of depolarizing pulses (50 ms) from a holding potential of -90 mV to voltages between -120 mV and 60 mV in steps of 10 mV. On the *right* the corresponding QV relations for holding at 0 mV and -90 mV are shown. They are not significantly shifted to one another ($p > 0.7$). (d) Gating and ionic currents of ShakerIR-F484A in response to depolarizing pulses from -90 mV to voltages between -120 mV to 60 mV in steps of 10 mV. (e) Effect of TEA (100 mM) (*top*) and change in reversal potential to -30 mV in the presence of TEA (*bottom*, $V = -70$ mV). Only ionic current is affected, while gating currents remain the same.

To prove conclusively that the open state stabilization causes the mode shift, we used the mutation Y485A, which prevents open state stabilization but leaves intact the coupling between the voltage sensor movement and pore opening (Batulan, Haddad et al. 2010). We obtained the two following results. First, similar to the QVs in the uncoupled mutants, the QVs of Y485A obtained at +60 mV (where the pores are open) and 0 mV were only slightly shifted compared to its QV_{90} (Fig. 3.2.3.a), suggesting that Y485A, like the uncoupled mutants, removes the mode-shift. Second, the $V_{1/2}$ of Y485A remained at -50 mV (Table III.II.I), like the QV_{90} of W434F, and not around -70 mV as the uncoupled mutants. So, in spite of the fact that the mode-shift is also removed in Y485A, this mutant remains in a different mode than the two uncoupled mutants I384N and F484G. This is in accordance to our hypothesis. It supports that the mode shift is caused by the release of the mechanical load and that the responsible stabilization of the open pore is the stabilization also giving rise to the slow component of the gating currents.

3.2.4.5. Strong coupling increases mode shift

The results above suggest that the pore is applying a load onto the voltage sensor during activation and pore opening. Once the pore is stabilized, this load is lifted. They also suggest that the stabilized pore has energetically only little influence on the deactivation of the voltage sensor as the QV is identical to the uncoupled mutants. This would suggest that closing of the pore is not required prior to voltage sensor deactivation. To further investigate this, we looked for a mutation that creates a tighter coupling between voltage sensor movement and pore opening. We chose the mutation I384A because alanine is although smaller than isoleucine still hydrophobic. We determined the QVs

at -90 mV and, due to the shift of the QV_{OFF} , also at -140 mV (QV_{90}) and 0 mV (QV_0) as well as the conductance voltage relationship GV at -90 mV and -140 mV (Fig. 3.2.3.b). The QV_{90} shifted to more positive potentials with respect to W434F (-34.6 mV, Table III.II.I), indicating that even more energy than in W434F was required to transit into the activated state. At the same time, the GV was shifted negatively (-32.6 mV), but to the same potential as the QV_{90} . The effect on QV and GV was inverse to the one caused by uncoupling. Pore opening followed the voltage sensor movement directly; the voltage sensor movement was, thus, very tightly coupled to pore opening. When we now held the resting potential at 0 mV, the QV_0 was strongly shifted to more negative potentials (-107 mV). The strong coupling between pore opening and the voltage sensor, therefore, keeps the voltage sensor in the activated state, and only strong hyperpolarizations can bring the sensors back to their resting state. At the same time, ionic currents deactivated very slowly (Fig. 3.2.3.b). This suggests that in I384A not only the voltage sensor can open the pore, but also the pore can keep the voltage sensor from returning to the resting state.

3.2.4.6. Weak coupling leads to low open probability

We also mutated the phenylalanine 484 in the S6 to alanine, as alanine, while still small, is more hydrophobic than glycine. In contrast to I384A, mutating F484A led to charge movement at more negative potentials and only to a slight shift between holding potentials at 0 mV and -90 mV (-58.5 ± 0.5 mV versus -63.8 ± 0.2 mV; Fig. 3.2.3.c, Table III.II.I). These are almost the characteristics observed with the uncoupled mutants. However, the GV of F484A followed a Boltzmann distribution with $V_{1/2} = -29$ mV, close to the wildtype channel. On first sight, these results seemed to contradict our findings that the shift is related to pore stabilization if it were not for a second phase in the GV (Fig. 3.2.3.c, *right*) and a transient component in the onset of the current traces (Fig. 3.2.3.d). At potentials more positive than +60 mV, the GV increased again in a second phase without reaching saturation in the voltage range tested (+170 mV). This second phase is thus similar to the GVs observed of the uncoupled mutants. The transient component in the ionic currents turned out to be gating currents as they remained unaffected when we shifted the reversal potential of the ionic current to -30 mV or

blocked the channel with TEA or 4-AP (Fig. 3.2.3.e). Both features indicate that the channel was not fully open at the first plateau of the GV around +25 mV. The amplitude of the gating currents at the first plateau was approx. $1/15^{\text{th}}$ of the ionic currents, which allows us to calculate the open probability in this region. Similar to I384N, we calculated the number of channels present in the clamped membrane based on the total gating charge and the number of open channels from the conductance. We found that the second number is approximately 50 times smaller than the number calculated from the gating charges; correspondingly, in the second phase even at +170 mV, it was still 34-fold lower. It is unlikely that we changed the gating charge per channel ($13 e^-$) because we did not mutate directly the voltage sensor. If we assume that we also did not significantly alter the open channel conductance (11 pS), we must have altered the number of channels which were opened by the activation of the voltage sensors ($P_{o,\text{MAX}} \cong 0.0035 \pm 0.001$).

The alternative is also consistent with our results; if, indeed, the single channel conductance was not constant but reduced 50-fold while neither pore residues nor electrostatic residues at the cytosolic entry to the ion conducting path were altered, the ions must have been hindered from entering the water-filled cavity. This would suggest that the helical bundle crossing at the cytosolic entry to the pore did not open to its full extend but instead only a “leak” current (~ 0.2 pS) was permitted. Thus, in both cases, we effectively uncoupled the voltage sensor from pore opening with only residual pore opening occurring, and, consequently, the QVs were similar to the uncoupled mutants.

3.2.4.7. W434F Mutation but not C-type inactivation influence mode shift mechanism

The lack of conductance in the mutant ShakerIR-W434F has been proposed to be caused by continuous C-type inactivation or by entering C-type inactivation very rapidly upon depolarizations (Yang, Yan et al. 1997). In light of the works that have linked C-typed inactivation and mode-shift (Olcese, Latorre et al. 1997; Olcese, Sigg et al. 2001), the concern may, thus, be raised that the inactivated W434F channel mutation might have influenced the development of the mode-shift. Therefore, we verified whether the same

shift of the voltage sensor movement were to occur in the conducting mutant during normal ion permeation by simultaneously following voltage sensor movement and pore opening with voltage-clamp fluorometry in the ShakerIR-A359C mutants.

When holding the resting potential at 0 mV, the FV_0 relationship ($V_{1/2} = -115$ mV, Table III.II.I) of the ShakerIR-A359C mutant shifted compared to the FV_{90} ($V_{1/2} = -47$ mV, Fig. 3.2.4.a). While the FV_{90} superposed with the QV_{90} of ShakerIR-W434F, the FV_0 was – compared to the QV_0 of -W434F – shifted to more negative potentials by $\Delta V_{1/2} = -41$ mV. When we repeated the same experiments with the uncoupled mutants I384N and F484G, however, the FV_0 , just as the QVs in the W434F mutants, did not significantly shift with respect to the FV_{90} ($V_{1/2} = -71$ mV and -70 mV for I384N and F484G, respectively, Fig. 3.2.4.a, Table III.II.I) and both superposed with the QVs of the respective ShakerIR-W434F mutants. All FVs of the respective –W434F mutants, including the FV_0 of ShakerIR-A359C-W434F, superposed with the QVs obtained earlier in the W434F background (Fig. 3.2.4.b), confirming that the fluorescence intensity report voltage sensor movement.

The shift of the FV_0 of ShakerIR-A359C beyond -70 mV indicated that not only – like in the W434F background – the voltage sensors are relieved from their mechanical load but also additional energy is necessary to return the voltage sensors to their resting position. We were able to rule out that this energy corresponds to the energy required by the strongly coupled mutant I384A to return the voltage sensors; when we tested the ShakerIR-A359C-I384A mutant, its FV_0 was also shifted by the same amount to more negative potentials to $V_{1/2} = -145$ mV ($\Delta V_{1/2} = -39$ mV) while the FV_{90} remained at $V_{1/2} = -39$ mV as the QV_{90} in the W434F background (Table III.II.I).

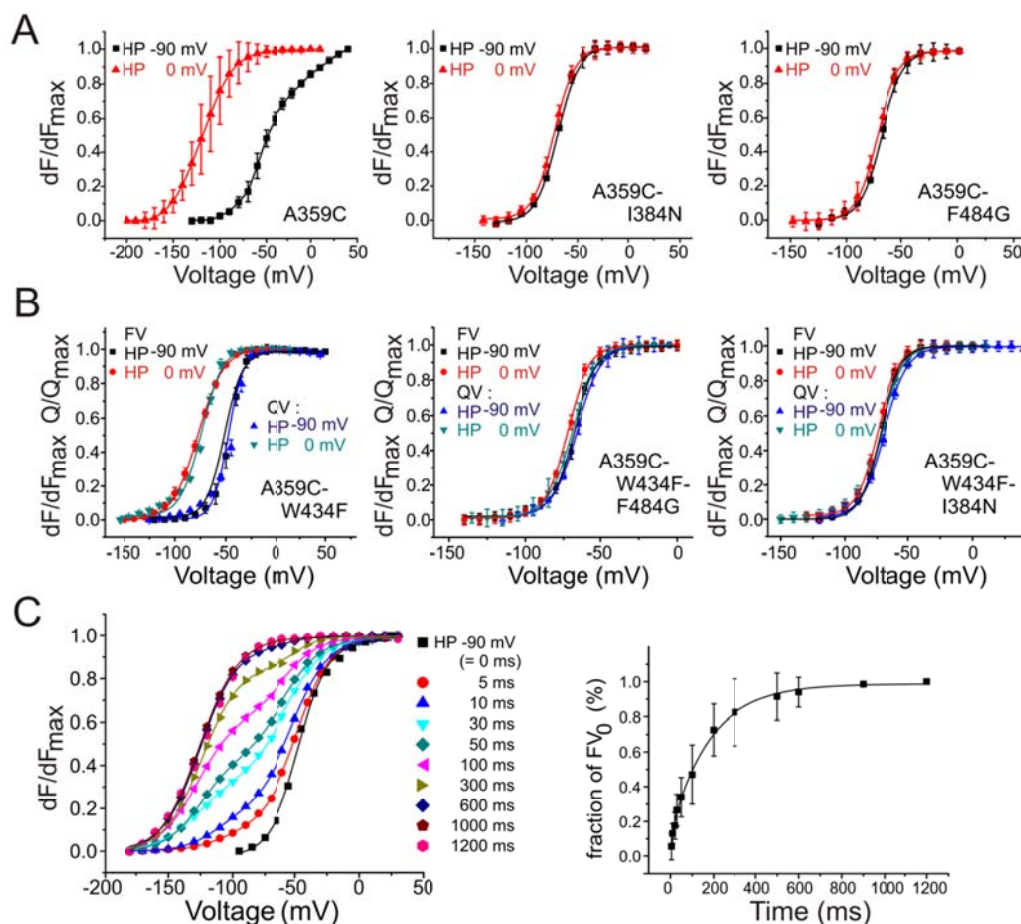


Figure 3.2.4. Mode shift in Shaker K⁺ channels.

FV curves for the three mutants ShakerIR-A359C, -I384N and -F484G for holding potential at -90 mV (*black*) and 0 mV (*red*) in response to a series of depolarizing pulses to a potential of -120 mV to 60 mV and 40 mV to -160 mV, respectively. Data shown are mean \pm SD. The FVs of A359C were significantly shifted ($p < 0.0001$), the uncoupled mutants not ($p \geq 0.3$). (b) Comparison of FV and QV curves of the three mutants ShakerIR-A359C-W434F, -I384N and -F484G for holding potentials at -90 mV and 0 mV in response to voltage pulses of 50 ms duration to voltages ranging between -160 and +50 mV in steps of 10 mV. (c) FV of ShakerIR-A359C from a holding potential of -90 mV to a pre-pulse of 0 mV for variable duration (0-1200 ms) followed by a series of pulses to +50 to -160 mV in steps of 10 mV. The FV curves were fitted to a sum of two Boltzmann curves. On the *right*, the fraction of the FV₀ Boltzmann as a function of the duration of the depolarizing pre-pulse is shown.

The additional stabilization of the open state seems to occur in the pore domain. For one, the W434F mutation is located near the selectivity filter of the pore so that a direct influence on the voltage sensor is unlikely. For another, uncoupling (I384N & F484G) prevents the additional energy observed in ShakerIR to develop or to be transferred to

the voltage sensor as we do not observe the mode shift in the uncoupled mutants. Hence, in both ShakerIR and –W434F, the mode shift appears to be caused by stabilization in the pore domain and is prevented by energetic uncoupling of the voltage sensor.

Presence of the mode shift not only in the W434F background but also in ShakerIR-A359C indicated that the mode shift is not caused by C-type inactivation in the W434F mutant. Nevertheless, we did observe a difference in the mode shift between ShakerIR and the –W434F mutant. This difference does not seem to be linked to C-type inactivation. If we plot the FV_0 after a depolarizing pre-pulse to 0 mV for variable durations between 0-1200 ms (Fig. 3.2.4.c, *left*), we find that the resulting distribution is a superposition of two Boltzmann curves representing the FV_{90} and the mode-shifted FV_0 . We can plot the fraction of channels in both modes as a function of the duration of depolarization and thus determine the time constants for entering the mode-shift ($\tau_{\text{slow}} = 181 \pm 14$ ms, $\tau_{\text{fast}} = 10 \pm 4$ ms; Fig. 3.2.4.c, *right*). This time constant is faster than the time constant for entering C-type inactivation.

3.2.4.8. Coupling leads to a slow conformational change of the S4

Uncoupling in I384N and F484G not only inhibited the mode shift in both ShakerIR and –W434F background – but also removed a slow conformational change of the S4 in the voltage sensor during prolonged depolarizations. This slow conformational change manifested itself in a slow increase in the fluorescence change in ShakerIR-A359C in response to a depolarizing pulse (Fig. 3.2.5.a & c). The time constant of the slow conformational change was in the range of 100 – 200 ms ($\tau_3 = 146 \pm 29$ ms at 0 mV) and thus much slower than voltage sensor activation or pore opening (Fig. 3.2.5.b). When we compare the slow time constant in the fluorescence with the time constant for entering the shifted mode (Fig. 3.2.4.c, *right*), we find that both correlate well. In the uncoupled mutants, in contrast, this slow conformational change was not observed (Fig. 3.2.5.c). Instead, the fluorescence saturated after about 25 ms for saturating pulses (Fig. 3.2.5.a). The slowest time constant observed was around 20 ms (Fig. 3.2.5.b).

In the W434F background, the slow component was also absent in the ShakerIR-A359C-W434F mutant. The reason was that the W434F mutant enters the mode-shifted state much faster. When depolarizing to 0 mV for variable duration (0-50 ms; Fig. 3.2.5.D, *left*) before determining the QV_0 , we find a time constant for entering the mode-shifted state of 4-9 ms (Fig. 3.2.5.d, *right*), which is faster than the slowest time constant found in the fluorescence time course of ShakerIR-A359C-W434F. We will, therefore, not be able to observe the conformational change in the fluorescence signal. The different time courses of ShakerIR and -W434F indicate that the additional stabilization of the wildtype channel occurs on a much slower time scale than the mode-shift in the W434F background.

The slow conformational change observed in the fluorescence signal of ShakerIR but not in -I384N and -F484G not only confirms that uncoupling blocks the mode shift, which seems mediated by open state stabilization *in the pore*; they also confirm that the mode shift is related to conformational changes *in the S4* of the voltage sensor. Slow conformational changes of the S4 helix were observed during prolonged depolarizations using voltage-clamp fluorometry both in HCN channels (Bruening-Wright and Larsson 2007) and in the Ci-VSP (Villalba-Galea, Sandtner et al. 2008). The time constants found in those measurements correlated well with the observed value for ShakerIR-A359C. So in spite of the voltage sensors being the driving force for the pore opening in response to depolarizations, the state of the pore (closed – open – open stabilized) also induces conformational changes back in the S4, which give rise to the mode shift observed in wildtype ShakerIR.

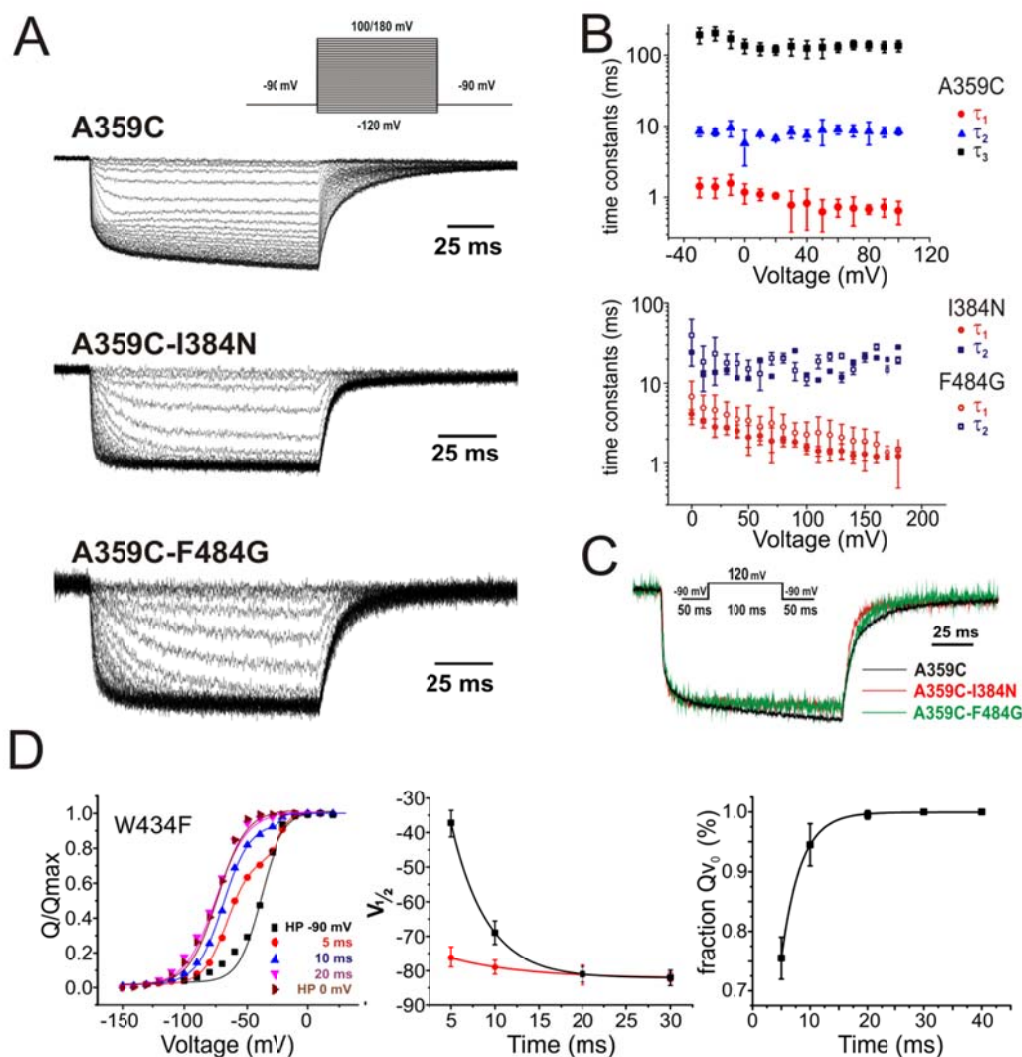


Figure 3.2.5. Fluorescence signal indicating conformational changes of S4.

(a) Fluorescence response to depolarizing pulses from -90 mV to voltages between -120 mV to 100 mV and 180 mV for ShakerIR-A359C and $-I384N/-F484G$, respectively, for a duration of 100 ms. Channels are fluorescently labeled with TMRM at position A359C on top of the S4. (b) Time constants of exponential fits of the onset of the fluorescence signal obtained in (a). Data are shown as mean \pm SD. (c) Comparison of fluorescence signals for saturating pulses of ShakerIR-A359C (*black*, $V_{1/2} = -37.5$ mV), $-I384N$ (*red*, $V_{1/2} = -55.4$ mV) and $-F484G$ (*green*, $V_{1/2} = -56.8$ mV). (d) QV of ShakerIR-W434F from a holding potential of -90 mV to a pre-pulse of 0 mV for variable duration (0 - 50 ms) followed by a series of pulses to $+30$ to -160 mV in steps of 10 mV. The QV curves were fitted to a sum of two Boltzmann curves. In the *center*, the shift of the V_{50} of the two Boltzmann distributions as a function of the duration of the depolarizing pre-pulse is shown. The shifts were fitted to single exponentials with time constants of $\tau = 4.0$ and 8.8 ms for more positive and more negative one, respectively. On the *right*, the fraction of the QV_0 Boltzmann as a function of the duration of the depolarizing pre-pulse is shown.

3.2.5. Discussion

By fully uncoupling voltage sensor movement and pore opening in the mutants I384N and F484G, we aimed to define the mutual influence between voltage sensor and pore domain. Our data suggest that the mode shift originates from the mechanical load that the pore imposes upon the voltage sensors, but, also, that it is the S4 that changes its conformation in the process.

3.2.5.1. Energetic uncoupling of the voltage sensors and pore domain

Our uncoupled mutants I384N and F484G are located in the region of the S4-S5 linker and the C-terminal S6 where an interaction forms between the S4-S5 linker and the S6 of the same subunit that mediates electromechanical coupling. The two residues – together with F481 – seem to tightly interact according to the crystal structure of Kv1.2 (Lu, Klem et al. 2001; Lu, Klem et al. 2002; Long, Campbell et al. 2005). While F484 is positioned in the motif N480-Y485 on the S6 (Lu, Klem et al. 2002), I384 precedes the putative interacting motif L385-S392 on the S4-S5 linker (Lu, Klem et al. 2002).

Uncoupling voltage sensors and pore domain from one another led to a separation of the voltage sensor movement (QV) and pore opening (GV), with overlap between both processes only over a small voltage range. The negative shift of the QV_{90} in our uncoupled mutants indicated that the voltage sensors required less energy to transit to the activated state. I384N and F484G are not the first mutants found to influence both gating and conductance differently. Previously other mutants have been described (Seoh, Sigg et al. 1996; Schoppa and Sigworth 1998; Soler-Llavina, Chang et al. 2006; Batulan, Haddad et al. 2010; Muroi, Arcisio-Miranda et al. 2010) that also disturb the energetic coupling between voltage sensor and pore. In our mutants I384N and F484G, however, the uncoupling was much more pronounced; it was almost complete. In I384N, even at potentials of +190 mV, only 0.8% of the channels opened, although all voltage sensors were in the activated position in both the non-conducting as well as wildtype ShakerIR. The fact that the channels still open to a small extent implicates, however, that a voltage-dependent step prevailed.

Based on the fact that the mutations were neither in the voltage sensor nor in the pore region, we can assume that the intrinsic properties of both domains were not altered. This suggests that the energy gained by uncoupling the sensors is used for pore opening in the coupled (wildtype) channel. The pore thus places a mechanical load onto the voltage sensors. This additional load implies that the pore is closed in its relaxed position and only opens with the help of the voltage sensors.

An alternative explanation for the opposing shift of QV and GV would be a strongly stabilized *activated-not-open* state preceding the open state in a sequential model. However, the mathematical description of such a model would be identical to uncoupling. To decide, therefore, whether uncoupling or stabilization of an intermediate state is more likely, the molecular determinants of the interaction have to be considered. A likely mechanism that led to uncoupling is the disturbance of the hydrophobic interaction between the S6 and the S4-S5 linker. The strength of coupling seems determined by a hydrophobic cleft formed by the C-terminal S6, into which the residues I384 and T388 of the S4-S5 linker insert (Labro, Raes et al. 2008). Introducing a hydrophilic residue in this cleft by replacing an isoleucine with an asparagine disturbed the coupling energy. Conversely, when we added an alanine in the same residue (I384A), the smaller hydrophobic residue led to an even stronger bond. However, given that introducing a cysteine at position I384(C; Table III.II.I) gave a similar phenotype as the alanine (I384A), the effect might be more complex than merely a hydrophobic interaction. On the opposite S6, the aromatic rings of the phenylalanines seem essential for the formation of the hydrophobic cleft. Replacing the phenylalanine with a small residue, either glycines or alanine (F484G/A), led to uncoupling. A similar non-polar interaction linking a phenylalanine and an isoleucine on two adjacent α -helices near the selectivity filter in KcsA has recently been described to be involved in the coupling mechanism between activation and C-type inactivation (Cuello, Jogini et al. 2010).

The alternative explanation, mentioned above, where the activated voltage sensor is stabilized by the mutation I384N in the activated-not-open state would imply that introducing an asparagine at this position leads to a strong link between the S4-S5 linker and its environment. While this might still be conceivable, it is more difficult to imagine

that the same effect occurs by the mutation F484G on the S6. It would also be difficult to explain why the stronger coupling (I384A), which shifts the QV_0 to even more negative potentials, leads to a negative shift of the GV, and not to a separation between QV and GV.

Also a destabilization of the resting state of the voltage sensor is not a possible explanation since, then, the GV would be shifted to more negative potentials. The exception would be that a single point mutation in the S4-S5 linker or S6 produced both the destabilization of the S4 and uncoupling of the pore from the voltage sensor. How likely does a single point mutation in the S4-S5 linker alter the intrinsic properties of the voltage sensor or the pore itself? According to the crystal structure, both residues I384 and F484 point toward the interaction area between the S4-S5 linker and the C-terminal S6 (Fig. 3.2.1a). A direct influence of both residues on the structure of voltage sensor or pore is therefore unlikely. The possibility remains that uncoupling leaves the pore and/or voltage sensor domain free to relax and assume an alternative conformation. Such an allosteric change in conformation, however, would be a structural consequence from the uncoupling, which is the mechanism that we suggest here (see below). The voltage sensor, for instance, would assume its “intrinsic” conformation in the absence of the mechanical load from the pore.

All things considered, uncoupling due to low interaction between S4-S5 linker and S6 seems to best explain the effects evoked by the mutations I384N and F484G, and we can assume that our uncoupling mutations I384N and F484G leave the intrinsic properties of the voltage sensors and the pore unaltered and merely influence the coupling between both domains. Under these assumptions, the difference in free energy that is needed to activate the voltage sensors will give a measure of the energy required in the wildtype channel to open the pore. Accordingly, we can approximate the energy required to open the pore from the shift of the QV in I384N and F484G. Since the slope of the QV does not alter during its shift, we can directly calculate the difference in free energy $\Delta\Delta G$ from the $\Delta V_{1/2} \cong -22 \pm 3$ mV and find that each voltage sensor has to procure 1.6 kcal/mol. As four voltage sensors are necessary to open the pore, pore opening requires 6.4 kcal/mol. This, however, is just an approximation as other small structural changes in

voltage sensor or pore domain might have altered the kinetics, too.

3.2.5.2. The mode shift is caused by a change in the mechanical load on the voltage sensor

Coming back to the mechanical load produced by the pore onto the voltage sensors, the energy that acts upon the voltage sensor during opening seems also linked to the mode shift of the voltage sensors observed in voltage-dependent ion channels (Bezanilla, Taylor et al. 1982; Brum and Rios 1987; Shirokov, Levis et al. 1992; Fedida, Bouchard et al. 1996; Olcese, Latorre et al. 1997; Olcese, Sigg et al. 2001; Piper, Varghese et al. 2003; Kuzmenkin, Bezanilla et al. 2004; Mannikko, Pandey et al. 2005; Bruening-Wright, Elinder et al. 2007; Bruening-Wright and Larsson 2007). During the mode shift at longer depolarizations, the voltage sensors shift their voltage dependence and, consequently, return to their resting position at more negative membrane potentials. Uncoupling of the voltage sensor from the pore domain in I384N and F484G prevented the QV to be shifted when holding the resting potential at -90 mV (QV_{90}) with respect to holding it at 0 mV (QV_0). This suggests an interpretation based on the free energy exchanged between the systems for the QVs. The voltage sensor is the “generator” that has to carry a certain “mechanical load”, the opening of the pore, which has different consequences dependent on the mutant. (1) If no mechanical load exists (I384N, F484G, F484A), the voltage sensor follows the QV intrinsic to the voltage sensors (~-70 mV) at all holding potentials. (2) As soon as the pore is coupled to the voltage sensor (wildtype), the voltage sensor has to provide the energy for pore opening and enters the “normal” activated state, following the more positive QV_{90} of $V_{\text{hold}} = -90$ mV. Under prolonged depolarizations, the pore is stabilized in the open state and, therefore, relieves the voltage sensor from the mechanical load. Consequently, the voltage sensors relax and deactivate following the more negative QV_0 . (3) If the pore is not stabilized in the open state (Y485A), the mechanical load onto the voltage sensor remains, and the QV follows at all holding potentials the QV_{90} . Thus, open pore stabilization is responsible in the wildtype channel for lifting of the mechanical load and, thereby, shifting of the voltage dependence of the voltage sensor.

The above hypothesis assumes that uncoupling is the underlying reason for the negative shift of the QV. This is a reasonable assumption – as we already discussed above – because otherwise two point mutations at different positions in the protein would lead to both uncoupling and a stabilization of the activated state of the voltage sensor. We cannot completely exclude the latter possibility, but even in that case, the underlying mechanism would remain the same as in Y485A no mode shift occurs in spite of the channels being open.

In the absence of the mutation W434F behind the selectivity filter, the voltage sensors require more energy to return to their resting state than the uncoupled mutants, indicating that here, not only the load of pore opening is relieved from the voltage sensors, but, in addition, the pore appears to have formed an interaction that further stabilizes it in the open state beyond the open state stabilization found in W434F (Fig. 3.2.6.a). This additional energy has to be overcome in order for the voltage sensors to return to their resting position, leading to the additional shift of the QV_0 to more negative potentials.

Our results indicate that the pore intrinsically prefers to be closed when the channel is in the resting position (i.e. before open state stabilization). In the uncoupled mutants, the pore is closed although the voltage sensors are fully activated, indicating that the pore intrinsically remains in the closed position unless stabilized by open pore stabilization. Only after prolonged depolarization, open state stabilization occurs and the pore autonomously remains open. One may say that the pore is a bi-stable system. This is even more so the case in ShakerIR than in the –W434F mutant due to its stronger stabilization of the open state. Provided that in ShakerIR the pore has formed an additional stabilizing interaction whereas in the –W434F mutant, the voltage sensor is moving freely, as suggested above, we can estimate the strength of the additional interaction from the difference of the two $\Delta\Delta G$ s obtained from the two mode shifts. The shift of the ShakerIR channel results in $\Delta\Delta G = 4.0$ Kcal/mol, leading to a difference to the –W434F mutant of 2.4 Kcal/mol for the stabilization of the open pore (Fig. 3.2.6.a).

In contrast to our suggestion of a bi-stable system, it had been proposed, previously, that the pore's default state is the open state and that the channel is under constant strain in the resting position (i.e. at -70 mV) (Bao, Hakeem et al. 1999; Upadhyay, Nagarajan et al. 2009). This is based on the fact that at 0 mV, the pore is mainly in the open state and charge neutralization of the positive charges in the S4 leads to a shift to more negative potentials of the GV. This, however, is misleading because in both cases the entire system of voltage sensor and pore were considered. The voltage sensor's neutral position is in the activated state (Gagnon and Bezanilla 2009). Neutralizing gating charges will diminish the force into the "resting" state and, thus, stabilize the voltage sensor in its activated position and, finally, lead to pore opening. The state of the pore in the wildtype channel at 0 mV, therefore, does not provide evidence on the intrinsic state of the pore domain.

Our hypothesis that the pore is intrinsically closed – before open pore stabilization - is supported by the fact that in the ILT mutant, the GV lies in the positive voltage range (Ledwell and Aldrich 1999; Gagnon and Bezanilla 2010). However, in the ILT mutant, the final voltage sensor movement occurs during pore opening (Smith-Maxwell, Ledwell et al. 1998; Ledwell and Aldrich 1999; Pathak, Kurtz et al. 2005), which again might influence the pore movement. The uncoupled mutants are different than the ILT mutants insofar as we do not see any charge movement with the final pore opening. However, as only 1% of all channels open, an eventual charge movement might not be detectable. Nevertheless, the uncoupled mutants differ also from the ILT mutants as the gating does not behave like activated not-open channels (fast off-gating currents) but show a slow off-gating component indicating that the activated voltage sensor is more stable. This supports our notion that the energy imposed by the pore is absent in the uncoupled mutants.

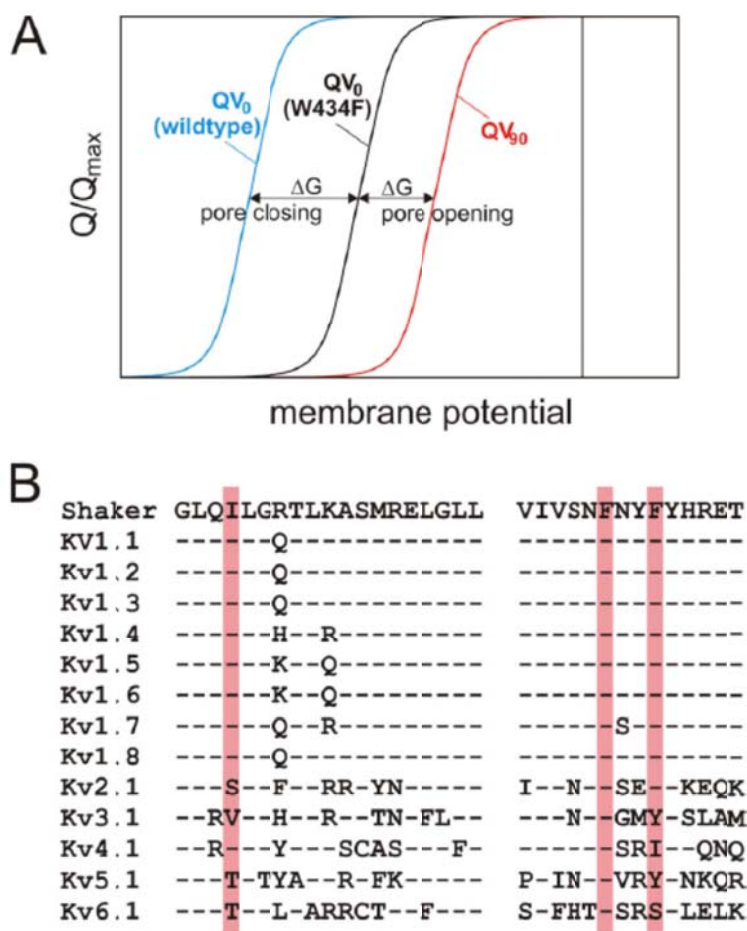


Figure 3.2.6. Alignment of Kv channels and energetics of mode shift

(a) Mode shift of the charge movement in ShakerIR and -W434F and relationship with the energies of pore opening and closing. (b) Alignment of the S4-S5 linker and C-terminal S6 region of human Kv channels. I384, F481 and F484 are marked in red.

3.2.5.3. Weak and strong coupling modulate voltage sensor behaviour

In the I384A channel, the energetic coupling to the pore seems to influence both directions activation and deactivation. Here, in contrast to the uncoupled mutants, QV_{90} and GV are not separated from one another but, instead, the QV is shifted to more positive and the GV to more negative potentials to such an extent that QV and GV superpose. This indicates that voltage sensor movement and pore opening occur simultaneously. The union of QV and GV was the exact opposite of what was observed in the uncoupled mutants, indicating that here the coupling is stronger; in fact, voltage sensor and pore are so strongly coupled that no “elasticity” remains in the system. The voltage sensors can move only in conjunction with pore opening. This is different in the

wildtype Shaker channel, where the voltage sensors move prior to pore opening. In I384A, the strong coupling means that each voltage sensor has to additionally overcome (part of) the energy barrier for pore opening. However, as more energy is transferred between voltage sensor and pore, the pore opens already at lower potentials.

Due to the bi-stable nature of the pore, also during closing/deactivation, the voltage sensors are held back by the pore. Before the pore can close or the voltage sensors can return to their resting position, open pore stabilization has to be broken again. For this reason, the mode shift of I384A is even stronger than that of wildtype. However, the slow component in ShakerIR-W434F off-gating currents demonstrates that also here the voltage sensors leave the activated state slower than without open state stabilization. This indicates that also in the wildtype channel the voltage sensor does not move fully independently while, in I384A, the voltage sensor is tightly coupled to pore movement.

The mutant F484A, on the other hand, is only weakly coupled. The activation of the voltage sensors leads to the first phase of the GV, which saturates at +25 mV, suggesting that at this potential the equilibrium and maximal open probability linked to voltage sensor movement has been reached. However, the ratio between gating and ionic current indicates that only 2% of all channels opened in equilibrium or that the pore only opened to a small extent. Thus, voltage sensor movement and pore opening are energetically only weakly coupled. Because of this weak coupling and the resulting low open probability or small opening, the energetic state of the pore does not influence as much the voltage sensor movement. Consequently, the QVs of the F484A mutant correspond to the uncoupled mutants' ones and the second phase of the GV does not saturate as in the uncoupled mutants whereas the first phase of the GV of F484A was similar to the GV of wildtype ShakerIR as residual coupling prevailed.

3.2.5.4. Mode shift is accompanied by movement of the voltage sensors

The mode shift, discussed above, had been shown to be linked to C-type inactivation (Olcese, Latorre et al. 1997), but our results suggest that, while C-type inactivation is linked to the mode shift, it is not its primary cause. First, the shift of the QV also occurs

in the conducting ShakerIR and is thus not specific to the continuously C-type inactivated W434F mutant. Second, in I384A, those channels whose sensors are held back in the activated state after stabilization of the open state are not C-type inactivated because of the observed slow decay of the ionic current caused by the slow deactivation of the voltage sensors. However, we showed in the W434F background that the mechanical load is modulated during open state stabilization and, thereby, likely also during C-type inactivation. Cuello et al. (Cuello, Jogini et al. 2010) recently demonstrated the link between the region of electromechanical coupling (S4-S5 linker, S6), where the open state stabilization occurs (Batulan, Haddad et al. 2010), and the selectivity filter, where C-type inactivation occurs. In the ShakerIR-I470C mutant (S6), although this link is disturbed (Holmgren, Smith et al. 1997; Cuello, Jogini et al. 2010), the same mode shift is observed (Olcese, Sigg et al. 2001). It seems, thus, that the conformational change occurring in the coupling region during open state stabilization is decisive for inducing the mode shift but that C-type inactivation is linked to this process. On the other hand, Villalba-Galea et al. (Villalba-Galea, Sandtner et al. 2008) demonstrated that a mode shift occurs also for the isolated voltage sensor of Ci-VSP. The state entered when holding at depolarizing potentials is called the relaxed state and is thought to be caused by a transition from a 3_{10} to an α helix in the S4 of the voltage sensor. In the absence of the pore, only a conformational change of the voltage sensor itself is possible as an underlying mechanism.

With our proposed mechanism, we can reconcile why the mode shift on one hand is linked to C-type inactivation (Olcese, Latorre et al. 1997; Olcese, Sigg et al. 2001) and open state stabilization but on the other hand also occurs in an isolated voltage sensor (Villalba-Galea, Sandtner et al. 2008). In ShakerIR-A359C, we observed a slow conformational change of the S4 during long depolarizations. Such a slow conformational change of the S4 has been linked to the relaxation of the voltage sensor in HCN channels and Ci-VSP (Bruening-Wright and Larsson 2007; Villalba-Galea, Sandtner et al. 2008). It is, therefore, likely that also in ShakerIR both processes – the conformational change internal to the S4 and the mode shift induced by the mechanical load – share a common mechanism. In all three cases, the time course correlated with the time course for entering the mode shift. In addition, the slow fluorescence change was

not observed in the uncoupled mutants -I384N or -F484G, indicating that uncoupling the pore from the voltage sensor prevented, or significantly slowed down, both the mode shift and the slow conformational change of the S4 in the voltage sensor. In the W434F background, the mode shift occurs within a few milliseconds such that the slow conformational change is not observed. It is also possible that the conformational change only arises in ShakerIR during the formation of the additional interaction, that led to a further shift of the FV_0 in ShakerIR, and does not happen in the -W434F mutants.

The possibility that the slow fluorescence change in the S4 is caused by additional voltage sensors entering the activated state is unlikely for two reasons; for one, 0 mV falls within the saturating region of the QV; for another, no steady increase in the ionic current was observed. Our findings, thus, indicate that the pore allosterically alters the structure of the voltage sensor by transferring a mechanical load through annealing between the S6 and the S4-S5 linker.

3.2.5.5. Relation to other Kv channels

We showed in the ShakerIR channel that the coupling between pore and voltage sensor is necessary for the mode shift to occur. We used the Shaker channel to investigate the effects of uncoupling, as most previous data is available from this channel. However, our results are, in all likelihood, applicable to other voltage-gated ion channels. Comparing different human analogues of Shaker, the Kv1 channels, one realizes that the region of electromechanical coupling is highly conserved (Fig. 3.2.6.b). Only the positions R387 and K390 are replaced by Q, K, H and Q, R, respectively. Among other Kv channel families, the region shows more variation. Nevertheless, the link between the S4-S5 linker and the C-terminal S6 has been confirmed for HCN (Decher, Chen et al. 2004) and HERG channels (Tristani-Firouzi, Chen et al. 2002), and it has been recently suggested for the voltage-gated sodium channels Na_V as well (Muroi, Arcisio-Miranda et al. 2010). While the mechanism of interaction between the S4-S5 linker and the S6 is conserved, the molecular determinants involved are different. For both HCN and HERG, electrostatic interactions play a dominant role (Tristani-Firouzi, Chen et al. 2002; Decher, Chen et al. 2004). For all these channels, HCN, HERG and Na_V , the mode-shift

has also been described (Bezanilla, Taylor et al. 1982; Piper, Varghese et al. 2003; Mannikko, Pandey et al. 2005; Bruening-Wright, Elinder et al. 2007; Bruening-Wright and Larsson 2007) so that it is likely that a similar mechanism as described in this manuscript exists in these channels.

The mode-shift in HCN channels is more pronounced than in the K_V channels and is thought to be important for preventing arrhythmias (Mannikko, Pandey et al. 2005; Bruening-Wright, Elinder et al. 2007; Bruening-Wright and Larsson 2007). In sodium channels, the shift might play a similar role as in the K_V channels, but also fast inactivation is controlled by depolarization and might, therefore, be subject to the mode shift. The mutual energetic influence between voltage sensor and pore domain thus seems to apply universally to a wide range of voltage-gated ion channels and to govern key functions such as recovery after excitation and stable firing rates (Mannikko, Pandey et al. 2005; Bruening-Wright, Elinder et al. 2007; Bruening-Wright and Larsson 2007).

3.2.6. Acknowledgements

We would like to thank Mireille Marsolais for technical support. This grant was financially supported by CIHR (MOP-102689), the Canada Research Chairs (950-202965) and the Canada Foundation for Innovation. GÉPROM is a research group funded by the Fonds de la recherche en santé Québec (FRSQ).

3.2.7. References

Armstrong, C. M., F. Bezanilla, et al. (1973). "Destruction of sodium conductance inactivation in squid axons perfused with pronase." *J Gen Physiol* **62**(4): 375-391.

Armstrong, C. M. and A. Loboda (2001). "A model for 4-aminopyridine action on K channels: similarities to tetraethylammonium ion action." *Biophys J* **81**(2): 895-904.

Barghaan, J. and R. Bähring (2009). "Dynamic coupling of voltage sensor and gate involved in closed-state inactivation of kv4.2 channels." *J Gen Physiol* **133**(2): 205-224.

Batulan, Z., G. A. Haddad, et al. (2010). "An intersubunit interaction between S4-S5 linker and S6 is responsible for the slow off-gating component in Shaker K⁺ channels." J Biol Chem **285**(18): 14005-14019.

Bezanilla, F. (2008). "How membrane proteins sense voltage." Nature Reviews Molecular Cell Biology **9**(4): 323-332.

Bezanilla, F. and C. M. Armstrong (1974). "Gating currents of the sodium channels: three ways to block them." Science **183**(126): 753-754.

Bezanilla, F., E. Perozo, et al. (1994). "Gating of Shaker K⁺ channels: II. The components of gating currents and a model of channel activation." Biophys J **66**(4): 1011-1021.

Bezanilla, F., E. Perozo, et al. (1994). "Gating of Shaker K⁺ channels: II. The components of gating currents and a model of channel activation." Biophys.J. **66**(4): 1011-1021.

Bezanilla, F., R. E. Taylor, et al. (1982). "Distribution and kinetics of membrane dielectric polarization. 1. Long-term inactivation of gating currents." J Gen Physiol **79**(1): 21-40.

Bezanilla, F., M. M. White, et al. (1982). "Gating currents associated with potassium channel activation." Nature **296**(5858): 657-659.

Bruening-Wright, A., F. Elinder, et al. (2007). "Kinetic relationship between the voltage sensor and the activation gate in spHCN channels." J Gen Physiol **130**(1): 71-81.

Bruening-Wright, A. and H. P. Larsson (2007). "Slow conformational changes of the voltage sensor during the mode shift in hyperpolarization-activated cyclic-nucleotide-gated channels." J Neurosci **27**(2): 270-278.

Brum, G. and E. Rios (1987). "Intramembrane charge movement in frog skeletal muscle fibres. Properties of charge 2." J Physiol **387**: 489-517.

Cha, A. and F. Bezanilla (1997). "Characterizing voltage-dependent conformational changes in the Shaker K⁺ channel with fluorescence." Neuron **19**(5): 1127-1140.

Cha, A. and F. Bezanilla (1998). "Structural implications of fluorescence quenching in the Shaker K⁺ channel." J Gen Physiol **112**(4): 391-408.

Chen, F. S., D. Steele, et al. (1997). "Allosteric effects of permeating cations on gating currents during K⁺ channel deactivation." J Gen Physiol **110**(2): 87-100.

Chen, F. S., D. Steele, et al. (1997). "Allosteric effects of permeating cations on gating currents during K⁺ channel deactivation." J.Gen.Physiol **110**(2): 87-100.

Chen, J. (2001). "The S4-S5 linker couples voltage sensing and activation of pacemaker channels." Proceedings of the National Academy of Sciences **98**(20): 11277-11282.

Chen, J., J. S. Mitcheson, et al. (2001). "The S4-S5 linker couples voltage sensing and activation of pacemaker channels." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **98**(20): 11277-11282.

Coquiere, D., A. de la Lande, et al. (2009). "Multipoint molecular recognition within a calix[6]arene funnel complex." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **106**(26): 10449-10454.

Cuello, L. G., V. Jogini, et al. (2010). "Structural basis for the coupling between activation and inactivation gates in K(+) channels." Nature **466**(7303): 272-275.

Decher, N., J. Chen, et al. (2004). "Voltage-dependent gating of hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated pacemaker channels: molecular coupling between the S4-S5 and C-linkers." J.Biol.Chem. **279**(14): 13859-13865.

del Camino, D. (2005). "Status of the Intracellular Gate in the Activated-not-open State of Shaker K⁺ Channels." The Journal of General Physiology **126**(5): 419-428.

Ding, S. and R. Horn (2003). "Effect of S6 tail mutations on charge movement in Shaker potassium channels." Biophys J **84**(1): 295-305.

Fedida, D., R. Bouchard, et al. (1996). "Slow gating charge immobilization in the human potassium channel Kv1.5 and its prevention by 4-aminopyridine." J Physiol **494** (Pt 2): 377-387.

Geiger, J. R. and P. Jonas (2000). "Dynamic control of presynaptic Ca²⁺ inflow by fast-inactivating K(+) channels in hippocampal mossy fiber boutons." Neuron **28**(3): 927-939.

Hackos, D. H., T. H. Chang, et al. (2002). "Scanning the intracellular S6 activation gate in the shaker K⁺ channel." J Gen Physiol **119**(6): 521-532.

Holmgren, M., P. L. Smith, et al. (1997). "Trapping of organic blockers by closing of voltage-dependent K⁺ channels: evidence for a trap door mechanism of activation gating." J.Gen.Physiol **109**(5): 527-535.

Hoshi, T., W. N. Zagotta, et al. (1990). "Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation." Science **250**(4980): 533-538.

Hoshi, T., W. N. Zagotta, et al. (1994). "Shaker potassium channel gating. I: Transitions near the open state." J Gen Physiol **103**(2): 249-278.

Imbrici, P., M. C. D'Adamo, et al. (2006). "Episodic ataxia type 1 mutations in the KCNA1 gene impair the fast inactivation properties of the human potassium channels Kv1.4-1.1/Kvbeta1.1 and Kv1.4-1.1/Kvbeta1.2." Eur J Neurosci **24**(11): 3073-3083.

Kanevsky, M. and R. W. Aldrich (1999). "Determinants of voltage-dependent gating and open-state stability in the S5 segment of Shaker potassium channels." J Gen Physiol **114**(2): 215-242.

Kuzmenkin, A., F. Bezanilla, et al. (2004). "Gating of the bacterial sodium channel, NaChBac: voltage-dependent charge movement and gating currents." J.Gen.Physiol **124**(4): 349-356.

Labro, A. J., A. L. Raes, et al. (2008). "Kv channel gating requires a compatible S4-S5 linker and bottom part of S6, constrained by non-interacting residues." J.Gen.Physiol **132**(6): 667-680.

Ledwell, J. L. and R. W. Aldrich (1999). "Mutations in the S4 region isolate the final voltage-dependent cooperative step in potassium channel activation." J.Gen.Physiol **113**(3): 389-414.

Loboda, A. and C. M. Armstrong (2001). "Resolving the gating charge movement associated with late transitions in K channel activation." Biophys J **81**(2): 905-916.

Long, S. B. (2005). "Crystal Structure of a Mammalian Voltage-Dependent Shaker Family K⁺ Channel." Science **309**(5736): 897-903.

Long, S. B. (2005). "Voltage Sensor of Kv1.2: Structural Basis of Electromechanical Coupling." Science **309**(5736): 903-908.

Long, S. B., E. B. Campbell, et al. (2005). "Crystal Structure of a Mammalian Voltage-Dependent Shaker Family K⁺ Channel." Science **309**(5736): 897-903.

Long, S. B., E. B. Campbell, et al. (2005). "Voltage Sensor of Kv1.2: Structural Basis of Electromechanical Coupling." Science.

Lopez, G. A., Y. N. Jan, et al. (1994). "Evidence that the S6 segment of the Shaker voltage-gated K⁺ channel comprises part of the pore." Nature **367**(6459): 179-182.

Lu, Z., A. M. Klem, et al. (2001). "Ion conduction pore is conserved among potassium channels." Nature **413**(6858): 809-813.

Lu, Z., A. M. Klem, et al. (2002). "Coupling between voltage sensors and activation gate in voltage-gated K⁺ channels." J.Gen.Physiol **120**(5): 663-676.

Mannikko, R., S. Pandey, et al. (2005). "Hysteresis in the voltage dependence of HCN channels: conversion between two modes affects pacemaker properties." J Gen Physiol **125**(3): 305-326.

Mannuzzu, L. M., M. M. Moronne, et al. (1996). "Direct physical measure of conformational rearrangement underlying potassium channel gating." Science **271**(5246): 213-216.

McCormack, K., W. J. Joiner, et al. (1994). "A characterization of the activating structural rearrangements in voltage-dependent Shaker K⁺ channels." Neuron **12**(2): 301-315.

Murata, Y., H. Iwasaki, et al. (2005). "Phosphoinositide phosphatase activity coupled to an intrinsic voltage sensor." Nature **435**(7046): 1239-1243.

Muroi, Y., M. Arcisio-Miranda, et al. (2010). "Molecular determinants of coupling between the domain III voltage sensor and pore of a sodium channel." Nat Struct Mol Biol **17**(2): 230-237.

Ogielska, E. M., W. N. Zagotta, et al. (1995). "Cooperative subunit interactions in C-type inactivation of K channels." Biophys J **69**(6): 2449-2457.

Okumura, A., M. Sano, et al. (2007). "Aromatic structure of tyrosine-92 in the extrinsic PsbU protein of red algal photosystem II is important for its functioning." FEBS Lett **581**(27): 5255-5258.

Olcese, R., R. Latorre, et al. (1997). "Correlation between charge movement and ionic current during slow inactivation in Shaker K⁺ channels." J.Gen.Physiol **110**(5): 579-589.

Olcese, R., D. Sigg, et al. (2001). "A conducting state with properties of a slow inactivated state in a shaker K(+) channel mutant." J Gen Physiol **117**(2): 149-163.

Pathak, M. (2004). "The Cooperative Voltage Sensor Motion that Gates a Potassium Channel." The Journal of General Physiology **125**(1): 57-69.

Pathak, M., L. Kurtz, et al. (2005). "The cooperative voltage sensor motion that gates a potassium channel." J Gen Physiol **125**(1): 57-69.

Perozo, E., R. MacKinnon, et al. (1993). "Gating currents from a nonconducting mutant reveal open-closed conformations in Shaker K⁺ channels." Neuron **11**(2): 353-358.

Piper, D. R., A. Varghese, et al. (2003). "Gating currents associated with intramembrane charge displacement in HERG potassium channels." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(18): 10534-10539.

Schoppa, N. E. and F. J. Sigworth (1998). "Activation of Shaker potassium channels. II. Kinetics of the V2 mutant channel." J.Gen.Physiol **111**(2): 295-311.

Schoppa, N. E. and F. J. Sigworth (1998). "Activation of Shaker potassium channels. III. An activation gating model for wild-type and V2 mutant channels." J Gen Physiol **111**(2): 313-342.

Seoh, S. A., D. Sigg, et al. (1996). "Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K⁺ channel." Neuron **16**(6): 1159-1167.

Shirokov, R., R. Levis, et al. (1992). "Two classes of gating current from L-type Ca channels in guinea pig ventricular myocytes." J Gen Physiol **99**(6): 863-895.

Sigg, D., H. Qian, et al. (1999). "Kramers' diffusion theory applied to gating kinetics of voltage-dependent ion channels." Biophys J **76**(2): 782-803.

Silverman, W. R., B. Roux, et al. (2003). "Structural basis of two-stage voltage-dependent activation in K⁺ channels." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **100**(5): 2935-2940.

Slesinger, P. A., Y. N. Jan, et al. (1993). "The S4-S5 loop contributes to the ion-selective pore of potassium channels." Neuron **11**(4): 739-749.

Smith-Maxwell, C. J., J. L. Ledwell, et al. (1998). "Uncharged S4 residues and cooperativity in voltage-dependent potassium channel activation." J.Gen.Physiol **111**(3): 421-439.

Soler-Llavina, G. J., T. H. Chang, et al. (2006). "Functional interactions at the interface between voltage-sensing and pore domains in the Shaker K(v) channel." Neuron **52**(4): 623-634.

Starkus, J. G., L. Kuschel, et al. (1997). "Ion conduction through C-type inactivated Shaker channels." J Gen Physiol **110**(5): 539-550.

Starkus, J. G., L. Kuschel, et al. (1998). "Macroscopic Na⁺ currents in the "Nonconducting" Shaker potassium channel mutant W434F." J Gen Physiol **112**(1): 85-93.

Stefani, E., L. Toro, et al. (1994). "Gating of Shaker K⁺ channels: I. Ionic and gating currents." Biophys J **66**(4): 996-1010.

Sutachan, J. J., I. Watanabe, et al. (2005). "Effects of Kv1.1 channel glycosylation on C-type inactivation and simulated action potentials." Brain Res. **1058**(1-2): 30-43.

Taglialatela, M., L. Toro, et al. (1992). "Novel voltage clamp to record small, fast currents from ion channels expressed in *Xenopus* oocytes." *Biophys.J.* **61**(1): 78-82.

Tao, X., A. Lee, et al. (2010). "A Gating Charge Transfer Center in Voltage Sensors." *Science* **328**(5974): 67-73.

Tristani-Firouzi, M., J. Chen, et al. (2002). "Interactions between S4-S5 linker and S6 transmembrane domain modulate gating of HERG K⁺ channels." *J.Biol.Chem.* **277**(21): 18994-19000.

Tytgat, J. and P. Hess (1992). "Evidence for cooperative interactions in potassium channel gating." *Nature* **359**(6394): 420-423.

Varga, Z., M. D. Rayner, et al. (2002). "Cations affect the rate of gating charge recovery in wild-type and W434F Shaker channels through a variety of mechanisms." *J Gen Physiol* **119**(5): 467-485.

Villalba-Galea, C. A., W. Sandtner, et al. (2008). "S4-based voltage sensors have three major conformations." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **105**(46): 17600-17607.

Yang, Y., Y. Yan, et al. (1997). "How does the W434F mutation block current in Shaker potassium channels?" *J Gen Physiol* **109**(6): 779-789.

Zagotta, W. N. and R. W. Aldrich (1990). "Alterations in activation gating of single Shaker A-type potassium channels by the Sh5 mutation." *J Neurosci* **10**(6): 1799-1810.

Zagotta, W. N. and R. W. Aldrich (1990). "Voltage-dependent gating of Shaker A-type potassium channels in *Drosophila* muscle." *J Gen Physiol* **95**(1): 29-60.

Zagotta, W. N., T. Hoshi, et al. (1990). "Restoration of inactivation in mutants of Shaker potassium channels by a peptide derived from ShB." *Science* **250**(4980): 568-571.

Zagotta, W. N., T. Hoshi, et al. (1994). "Shaker potassium channel gating. III: Evaluation of kinetic models for activation." *J Gen Physiol* **103**(2): 321-362.

Zagotta, W. N., T. Hoshi, et al. (1994). "Shaker potassium channel gating. II: Transitions in the activation pathway." *J Gen Physiol* **103**(2): 279-319.

4. Discussion

4.1. Avant-propos

Dans cette partie, chaque section débutera par un petit « résumé » suivi d'une section détaillée qui soulignera certains aspects pertinents de la discussion. Une hypothèse globale sera introduite à la fin pour décrire le processus complet du couplage entre la détection du voltage et la conduction ionique.

D'ailleurs, compte tenu des publications précédentes, l'analyse des résultats est fortement focalisée sur la composante du « OFF-gating » et souvent le « ON-gating » n'est pas discuté. La raison en est que l'altération du couplage électromécanique est observée durant la fermeture du canal (« OFF-gating »), lors du mouvement de charge durant les nombreuses transitions séquentielles ramenant le segment S4 à sa position initiale. On observe peu d'effet sur le courant de « ON-gating », puisque le mouvement de charge se produit majoritairement dans les premières transitions de la translocation de S4.

4.2. Article 1 : L'asymétrie

4.2.1. Résumé

La question concernant l'asymétrie observée dans les courants de « gating » a été démontré de façon définitive. Les résultats obtenus dans l'article de Batulan et al., 2010 suggèrent que cette composante est directement reliée à la stabilisation de l'état ouvert (*Kanevsky et Aldrich, 1999*). En effet, nous avons identifié l'interaction RELY, composée des résidus Y485 sur S6 d'une sous-unité et R394, E395 et L398 sur S5 de la sous-unité adjacente, comme étant l'interaction responsable de la stabilisation de l'état ouvert/activé des canaux Shaker K+.

L'analyse de ces résultats illustre le mécanisme qui contrôle la stabilisation de l'état ouvert. Nous avons démontré qu'en absence du glutamate situé à la position 395 (E395A), l'interaction entre la tyrosine 485 et l'arginine 394 devient assez grande pour complètement immobiliser le senseur dans l'état ouvert. Cette immobilisation est observée par le retour très lent du « OFF-gating ». En revanche, la mutation Y485A déstabilise l'état ouvert et accélère le retour du courant de «OFF-gating ». Le modèle émergent propose que durant le mouvement de S4, les charges électrostatiques positionnées en E395 et R394 interagissent avec le groupement hydroxyle de la position Y485. Cette interaction de longue portée influence la stabilisation de la tyrosine 485 dans une petite poche formée par les résidus R394, E395 et L398. L'immobilisation est causée par les interactions RELY de petite portée. Ce changement de conformation est lié à l'ouverture du pore centrale. De plus, on a démontré, avec les expériences de 4-AP, que cette stabilisation s'initie dans l'état activé avant l'ouverture du canal. En conclusion, la dernière transition coopérative est reliée à la stabilisation de l'état ouvert.

4.2.2. Discussion de l'article 1

4.2.2.1. La stabilisation et non l'inactivation lente

Ces résultats démontrent que l'asymétrie entre les composantes de « gating » est directement reliée à la stabilisation de l'état ouvert et non à l'inactivation de type C. L'inactivation de type C avait été suggérée comme cause de l'asymétrie observée en raison de la mutation qui ne conduit pas W434F, située dans le pore de conduction. Afin de confirmer que l'interaction RELY se développe autant dans la construction W434F qu'en conditions physiologiques perméables (A359C), des mesures de fluorescence en voltage imposé ont été menées. Ces mesures ont montré que la composante lente du courant de « OFF-gating » n'est pas spécifique à la mutation W434F, car nous avons pu observer, dans des canaux conducteurs marqués où l'inactivation de type C était absente (T449Y), l'accélération du senseur de voltage en éliminant l'interaction RELY (Y485A et E395D) ainsi que le retour décéléré du senseur de voltage en la stabilisant (E395A).

4.2.2.2. La validation de l'analyse

Les résultats expérimentaux furent validés par le développement d'un modèle cinétique adéquat qui décrit les comportements énergétiques sous des critères minimalistes. Certaines considérations ont aidé au développement de ce modèle, les voici.

Tout d'abord, on considère que les mutations de la région RELY n'affecteront pas les premières transitions responsables ($C \rightarrow A_1$ et $A_1 \rightarrow A_2$) dans le transfert de charge (Q). Cela tient du fait que nous ne varions pas la quantité de charges déplacées lors de la translocation de S4. Tel que mentionné dans l'introduction, le modèle standard contient quatre états fermés responsables du transport de Q. Cependant, seul le comportement des transitions se produisant après le transfert de charge majeur nous intéresse. Sachant qu'on ne modifie pas la quantité de charges transportées, nous les avons regroupées selon la relation Q-V globale présentée par Bezanilla *et al* en 1993.

Ensuite, on considère que la cinétique du « gating » représente la rapidité de translocation du segment S4. Cette rapidité repose sur l'interaction entre deux sous-unités qui modifie le « poids mécanique » du pore sur le senseur de voltage adjacent. Lorsque l'interaction coopérative entre le senseur et le pore est présente, le senseur est tiré dans une position plus stable (stabilisation ou immobilisation), mais lorsque ce poids est absent, le senseur est empêché de rentrer dans cet état (déstabilisation).

Pour finir, puisqu'on observe une conductance ionique saturable chez tous les mutants, la perte de l' « OFFSET » n'affaiblit pas le couplage électromécanique. Cependant, la relation G-V des mutants déstabilisés (Y485A et E395D) nécessite deux courbes Boltzmann. Pour concorder avec ce phénomène, l'ouverture du pore doit être gouvernée par deux transitions séquentielles impliquant le couplage électromécanique.

4.2.2.3. Le modèle

Cette section résume les propriétés du modèle séquentiel présenté dans la section méthodologie. Ce modèle assume que les deux premières transitions séquentielles transportent la majorité des charge de transfert (Q) avec un ratio de 0.45Q pour la

première transition ($C \leftrightarrow A_1$), et de $0.55Q$ pour la deuxième ($A_1 \leftrightarrow A_2$) (Figure 4.1). Les dernières transitions ($A_2 \rightarrow A_S$) décrivent le couplage électromécanique entre le senseur et le pore. En assumant que les deux premières transitions du modèle de 5 états transportant la charge totale soient jumelées ($C \leftrightarrow A_2$), la population d'occupation d'un état, disons C, s'écrit comme suit



Figure 4.1. Le modèle cinétique

$$C(t \rightarrow \infty) = \frac{1}{1 + \frac{\alpha}{\beta} \left(1 + \frac{\gamma}{\delta} \left(1 + \frac{\varepsilon}{\phi} \right) \right)} \quad (4.1)$$

où les taux de transition vers l'état ouvert sont α , γ et ε , et ceux vers l'état fermé β , δ , ϕ . Il est évident que si on se retrouve avec une transition qui favorise l'état fermé, $\beta \gg \alpha$, les transitions suivantes (δ, ϕ) auront un effet mineur sur la population de C.

Dans le contexte de cette étude, la population de C représente la quantité de senseurs de voltage qui n'ont pas déplacé leur charge dans l'état activé. Autrement dit, la quantité de charges de « gating » Q mesurée en « cut-open voltage clamp » est équivalente à la quantité de charges qui ne sont pas dans cet état, $Q/Q_{\max} = 1 - C$. Cela implique directement que A_S représente l'état conducteur et ainsi la conductance G. Ces relations s'expriment comme suit.

$$\frac{Q}{Q_{\max}} = 1 - C = 1 - \frac{1}{1 + \frac{\alpha}{\beta} \left(1 + \frac{\gamma}{\delta} \left(1 + \frac{\varepsilon}{\phi} \right) \right)} \quad (4.2)$$

$$\frac{G}{G_{\max}} = A_S = \frac{1}{1 + \frac{\phi}{\varepsilon} \left(1 + \frac{\delta}{\gamma} \left(1 + \frac{\beta}{\alpha} \right) \right)} \quad (4.3)$$

La quantité de charges Q déplacées par la première transition doit donc être plus grande que la moitié de la charge totale $Q > 1/2$ dans les conditions d'équilibre ($\alpha = \beta$). En effet, le $V_{1/2}$ du système entier sera toujours plus négatif que celui des transitions transportant

les charges, de même que la relation Q-V sera toujours déplacée vers des potentiels plus négatifs (Figure 4.2).

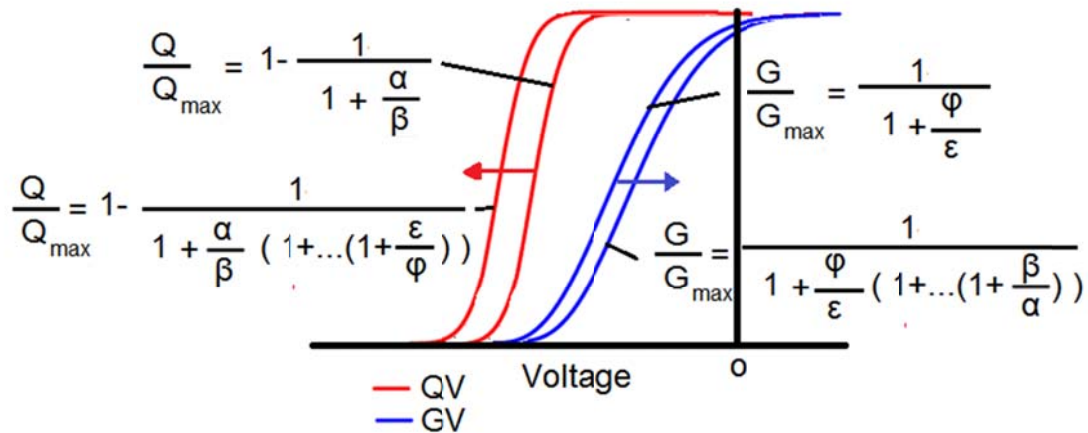


Figure 4.2. Le Schéma cinétique qui sous-tend les équations 4.1. et 4.2

Dans un modèle séquentiel à plusieurs états, la population de A_1 doit nécessairement être toujours plus petite que le rapport des transitions définissant un modèle d'une transition entre deux état ($\beta/(\alpha + \beta)$). En effet, c'est à cause que le ratio α/β est toujours multiplier par un facteur $(1+\delta/\gamma)$ qui sera toujours plus grand que 1. Ainsi, le dénominateur de l'équation multi-séquentielle sera toujours plus grand que celle d'un modèle définissant une seul transition. Par conséquent, plus il se trouvera de transitions dans un modèle séquentiel, plus la population de A_1 sera faible.

Par ailleurs, les transitions qui ne transportent par les charges ($A_3 \rightarrow A_5$) ne peuvent jamais déplacer le potentiel d'équilibre de la relation Q-V vers des potentiels plus positif que le potentiel des transitions qui transportent les charges ($C \rightarrow A_2$) ($V^{1/2}$, $\alpha = \beta$) puisque ces transitions ne transportent pas de charges. Donc, dans des conditions où le ratio des transitions éloigné (ϵ/ϕ) est grand, on observera donc un déplacement de la relation Q-V vers la gauche.

Dans le cas de la G-V, puisque sa dépendance au voltage est contrôlée par la dernière transition, les états éloignés de l'ouverture ne l'affecteront pas. Selon l'équation 4.3, les premières transitions ($C \rightarrow A_2$, $A_2 \rightarrow A_3$) ne pourront jamais déplacer la relation G-V à

des potentiels plus négatifs que la dernière transition. Toutefois, un ratio δ/γ faible aura pour conséquence de déplacer la relation G-V vers des potentiels positifs.

4.2.2.4. Les interprétations du modèle

Les fondements de ce projet reposent sur la capacité du modèle utilisé à correspondre aux trois comportements principaux observés lorsqu'on déstabilise l'interaction RELY d'une même sous-unité. Les phénomènes sont les suivants : (i) la modulation de la force des interactions responsables dans la stabilisation, (ii) les changements observés dans les relations Q-V et (iii) la possibilité d'avoir une G-V qui suit la caractéristique d'une double fonction de Boltzmann.

Afin de modéliser et d'expliquer ces trois comportements, nous avons fitté les résultats de « gating » avec le modèle séquentiel présenté ci-dessus. Par la suite, nous avons comparé les résultats des trois $V_{1/2}$ ($C \leftrightarrow A_1$, $A_1 \leftrightarrow A_2$, $A_3 \leftrightarrow A_S$) obtenus avec le W434F par rapport aux deux mutants représentant les différents extrêmes : le mutant Y485A, qui illustre la déstabilisation de l'état ouvert (symétrie de « gating »), et la mutation E395A qui, au contraire, stabilise l'ouverture du pore (« OFF-gating » absent).

Pour le type sauvage W434F, on note deux caractéristiques d'intérêt. D'abord, la première transition ($C \leftrightarrow A_1$) a un $V_{1/2} = -25.1$ mV plus positif que la seconde transition ($A_1 \rightarrow A_2 = -83.4$ mV) (Figure 3.1.10), ce qui signifie que la quantité de charges transférées durant la deuxième transition requiert moins d'énergie que celle durant la première. Indirectement, cela signifie que les transitions se font énergétiquement plus tôt. Alors, les taux de transition vers l'ouverture sont beaucoup plus grands que ceux vers la fermeture (Figure 3.1.10). Autrement dit, la deuxième transition favorise le système à être dans l'état ouvert. En conséquence, le $V_{1/2}$ global de la relation Q-V (-50mV) est plus petit que la transition « native » -25.1 mV. Pour les deux dernières transitions, $A_2 \rightarrow A_3$ et $A_3 \rightarrow A_S$, leur $V_{1/2}$ sont identiques, alors l'une d'entre elles peut être négligeable. D'ailleurs, elles expriment une dépendance au voltage qui semble venir de l'ouverture et fait allusion à l'interaction coopérative des sous-unités.

Si on compare le type sauvage à la mutation E395A, le ratio (ε/ϕ , $\varepsilon \gg \phi$) des constantes de temps obtenu à la dernière transition ($A_3 \rightarrow A_5$) est beaucoup plus grand. D'ailleurs, le taux de transition vers l'ouverture, dont la valeur est identique au W434F, demeure toujours plus grand que celui vers la fermeture.

Pour la première transition ($C \rightarrow A_1$), le potentiel d'équilibre est déplacée de 13 mV tandis que pour la transition ($A_1 \rightarrow A_2$), elle est déplacée vers de très grandes valeurs négatives qui ne pouvaient être déterminées. Cela veut dire que l'énergie nécessaire pour amener le senseur dans l'état ouvert est encore moindre comparé à W434F. Autrement dit, durant le « OFF-gating », le mouvement des charges est contrôlé seulement par l'énergie de la première transition puisque les transitions subséquentes favorisent toutes une forte transition vers l'état ouvert. Donc, selon notre modèle, ce résultat devrait déplacer la relation Q-V globale vers des potentiels négatifs et ramener le senseur de voltage de manière très lente à son état de repos. C'est ce qui est observé à la Figure 3.1.4.

En revanche, pour la mutation Y485A, le ratio de la dernière transition est inversé par rapport à E395A. Il est très faible et toujours plus rapide vers la fermeture. Les taux de transition suggèrent que l'état final n'est jamais atteint. En d'autres termes, la stabilisation est absente et les dernières transitions sont découplées. De plus, puisque les $V^{1/2}$ de la première et la deuxième transition ne sont que sensiblement accélérés par rapport au W434F, le fit indique que la transition globale de $V^{1/2}$ n'est pas grandement déplacée par rapport à W434F. Toutefois, bien que la quantité de charges transportées ne soit pas modifiée, la pente V_S diminue. Puisque le domaine RELY suggère une interaction sous-unitaire, ce changement définit exactement le comportement énergétique du découplage de la coopérativité sous-unitaire.

Si on utilise les potentiels d'équilibre mesurés avec le mutant Y485A en gardant les premières transitions Q-V intactes, juste en changeant les transitions définissant le couplage électromécanique, on peut expliquer les différents effets des relations G-V et Q-V pour les mutants déstabilisant l'état ouvert (Y485A et E394D). Ceci est en fait le but principal du modèle et du projet. L'élaboration de ce modèle nous a donc permis

d'expliquer les comportements opposés de la G-V et Q-V des mutant E395A et Y485A. Ainsi, on peut voir que ce modèle minimaliste, représente bien les résultats observés.

4.2.2.5. Interprétation atomique

Afin de comprendre l'effet de la position E395 sur les interactions RELY, le glutamate fut remplacé par des acides aminés de propriétés différentes (charge, grosseur, structure). La conséquence principale fut le déplacement du potentiel d'équilibre de la relation Q-V (E395D, +5 mV; E395E, 0 mV; E395A, -16 mV; E395R, -30 mV). Une charge positive à cette position renforce la stabilisation du senseur de voltage dans l'état activé. Cette position joue donc un rôle important dans l'interaction électrostatique et la stabilisation de l'état ouvert. Étant donné la grande portée des forces électrostatiques, il se peut que l'attraction se manifeste avant la stabilisation de l'état ouvert. Ceci évoque l'intérêt d'éclaircir les partenaires localisés dans le domaine RELY qui interviennent dans cette interaction électrostatique. Nous avons conclu que la tête hydroxyle de la tyrosine située à la position 485 était l'élément nécessaire pour partager l'interaction entre le peptide E395 et R394. Il s'agissait de vérifier l'effet des mutations sur les relations Q- et G-V qui excluaient ce groupe fonctionnel tel que Y485H, Y485A, Y485F et Y485C. Tous ces mutants ont montré une perte dans la stabilité de leur état ouvert. De plus, dans le cas où on introduit une double mutation pour EY-AA, le découplage coopératif reste conservé.

Dans le même ordre d'idées, c'est la taille atomique des résidus positionnés en 398 et 394 qui influencent le déplacement de la relation Q-V. En effet, le raccourcissement de l'arginine 394 (-A) déplace la Q-V vers des potentiels positifs. De plus, les mutations R394E et R394Q ont démontré que l'altération de la charge n'avait qu'un effet minime sur la courbe Q-V. La cause principale vient de sa caractéristique atomique à la position C δ , suggérant que c'est à cette position que l'interaction avec la tyrosine et l'arginine existe. Cette interaction est créé par le lien hydrogène entre R394 (C δ) et la tyrosine 485. Cela est appuyé par le fait que la double mutation RE-AA diminue grandement la forte interaction développée entre R394 et Y485 en présence de E395A.

D'ailleurs, on remarque le même effet progressif sur le déplacement de la courbe Q-V en fonction de la taille du résidu pour la leucine 398 : L398I (+18 mV), L398V (+7 mV), L398L (0 mV), L398N (-3 mV), et L398W (-11 mV). Les seuls mutants qui éliminent le « OFFSET » sont L398I and L398V. La différence remarquable entre la leucine et l'isoleucine est le positionnement de C δ 2 sur C β et non C γ . Au contraire, dans la mutation L398N, on retrouve en C δ 2 un groupement polaire, NH₂, qui n'a pas réellement d'effet sur l'interaction avec la tyrosine. Ceci suggère que le C δ 2 fait partie de l'interaction qui stabilise Y485 dans l'état ouvert. Selon la structure cristalline, la leucine 398 illustre une interaction de type CH- π (Okumura, Sano *et al.*, 2007; Coquiere, de la Lande *et al.*, 2009) entre le cycle aromatique de Y485 et C δ 2 de L398. Puisque les résidus isoleucine et valine n'ont pas le groupement C δ 2, ils ne peuvent développer cette interaction de type π . Ainsi, on ne voit pas la composante lente de l'« OFFSET ».

4.2.2.6. Perspectives

Les résultats démontrent clairement que le domaine RELY forme l'interaction décisive qui contrôle l'asymétrie cinétique du « gating ». Toutefois, pour démontrer l'implication de l'interaction CH- π entre la leucine 398 et la tyrosine 485, nous devons observer un découplage complet avec la mutation REL-AAA. Cette mesure quantifiera les partenaires responsables dans la coopérativité des sous-unités. La mutation Y485A découple l'interaction entre deux sous-unités ; la mutation REL-AAA devrait faire la même chose puisque l'interaction CH- π ainsi que les groupements responsables dans l'interaction entre R394, E395 et Y485 disparaîtront.

De plus, pour bien démontrer l'implication du groupement OH de la tyrosine 485 avec le glutamate 395 et l'arginine 394, la double mutation YL-FA devra être introduite. Dans ce cas, le groupement OH ainsi que la liaison CH- π seront éliminés et nous devrions obtenir un découplage coopératif total.

4.2.2.7. Conclusion

Cette étude a fourni de précieux renseignements sur la fonction des canaux potassiques de type Kv. Par ailleurs, une des mutations illustrant le découplage entre deux sous-unités, E395D, est connue pour causer un désordre neurologique : l'ataxie épisodique de type 1 (Imbrici, D'Adamo et al., 2006). L'appariement des interactions dans le domaine RELY souligne un cas de cette canalopathie.

4.3. Article 2 : Le « Mode Shift »

4.3.1. Résumé

Dans ce deuxième communiqué, nous avons établi que l'origine du « mode shift » provient du « poids mécanique » que le pore impose sur le senseur de voltage. Le découplage complet de la liaison S4-5L et S6 reliant le pore au senseur entraîne une diminution de l'énergie nécessaire pour activer le senseur et abolit complètement le « mode shift » survenant au cours de longues dépolarisations. De plus, pour revenir au repos, les senseurs de voltage suivent la relation intrinsèque QV_0 et non la relation énergétique native, QV_{90} . Les mesures non saturantes de fluorescence en voltage imposé ont également montré l'absence d'un changement de conformation de S4 chez les mutants découplés. C'est ainsi que nous avons souligné que le « mode shift » est relié à la relaxation du senseur de voltage lorsque le pore se stabilise dans l'état ouvert. Autrement dit, ce changement de conformation est influencé de façon allostérique par le pore.

4.3.2. Discussion de l'article 2

Il a d'abord été question de déterminer les acides aminés qui servent d'intermédiaire pour le couplage électromécanique. Les mutants découplant I384N et F484G, localisés sur le lien S4-5L et S6, ont conduit à une séparation presque complète entre le mouvement de charge (Q-V) et la conductance du pore (G-V). Le déplacement négatif de la courbe Q-V signifie que le senseur nécessite moins d'énergie pour ouvrir. Donc,

puisque ces mutants découplent et diminuent l'énergie nécessaire pour amener le senseur dans l'état ouvert, le pore représente une force opposée au mouvement du senseur. Ceci conclut que son état fermé représente sont état au repos.

Par ailleurs, le découplage nous a permis d'approximer l'énergie couplant les deux domaines, autrement dit, l'énergie nécessaire pour ouvrir le pore. Puisque la quantité de charges n'est pas modifiée (V_S), nous avons calculé la différence d'énergie libre, c'est-à-dire l'énergie nécessaire pour ouvrir le pore avec quatre senseurs de voltage. Dans l'hypothèse où nos mutations modifient seulement le couplage, l'énergie est de 6.4 Kcal/mol, une valeur utile lors de modélisations par dynamique moléculaire.

Une autre conclusion intéressante fut le type d'interaction responsable dans le couplage électromécanique. Selon les différentes mutations utilisées, nous suggérons que le couplage est dû aux groupements hydrophobes et aromatiques de la région. L'absence de cycle aromatique dans la région S6 mène directement au découplage (F484A). D'autres mutations de la même région d'interaction telle que F484E et F484R (non publié) et les mutations F481A et F481G (non publié) ont suggéré le même comportement de découplage observé dans les distributions Q-V et, pour certain, G-V. Toutefois, l'expression du courant de « gating » des mutants F481 était très petite (1 à 2 μ A). Même si cela semble assez pertinent pour être inclus dans l'article, le problème résidait dans la conductance. Aucun courant macroscopique des mutations de F481 ne fut observé. Cela signifiait que le mutant ne s'exprimait pas ou que la conductance n'était pas mesurable en conditions physiologiques (testé jusqu'à 190 mV). Une expérience intéressante fut le marquage de F481A-A359C, où la présence d'une sonde fluorescente a provoqué une présence minime de courant ionique. Cela suggère que le poids du fluorophore a un effet sur la fonction du canal dans le cas de cette mutation.

Les observations fondamentales qui nous ont suggéré l'explication du mécanisme entourant le « mode shift » furent celles de l'abolition du déphasage entre la relation QV_{90} et QV_0 lors de l'incorporation des mutations I384N et F484G. Deux comportements essentiels ont permis de compléter le projet. Premièrement, lors du découplage (I384N, F484G, F484A), le senseur de voltage suit la relation intrinsèque

QV_0 pour n'importe quel potentiel de maintien. Cela suggère que le senseur entre dans un état différent en absence du « poids mécanique ». Deuxièmement, lorsque le pore et le senseur sont couplés, ce dernier entre dans l'état normal d'activation suivant la relation énergétique QV_{90} . D'ailleurs, compte tenu de l'article précédent, nous avons remarqué que la stabilisation de l'état activé/ouvert influençait le comportement du « mode shift » aussi. Par exemple, la mutation Y485A, qui déstabilise l'état ouvert, élimine aussi le « mode shift », même si la relation énergétique de QV_{90} est conservée. Sachant que Y485A ne découple pas le senseur du pore, le poids du pore est le facteur primaire qui empêche le senseur de suivre son comportement intrinsèque, et de là découle le « mode shift ».

Dans le cas où le senseur de voltage devient fortement couplé au pore (I384A), non seulement doit-il surmonter le poids mécanique du pore, mais aussi la stabilisation de l'état ouvert. C'est pour cette raison que le déphasage entre les relations QV_0 et QV_{90} est encore plus grand que pour celui du type sauvage. Ceci amène une conclusion intéressante. Il en découle qu'il existe, pour le type sauvage, une élasticité dans le couplage électromécanique due aux différences observées par rapport à la relation de Q-V et G-V du mutant I384A. Dans le cas d'I384A, l'activation du senseur suivie par l'ouverture du pore est un mécanisme instantané.

Afin de confirmer que le « Mode Shift » n'est pas l'inactivation de type C, nous avons eu recours à la fluorescence en voltage imposé. Ces expériences ont démontré que le déphasage illustré par le « Mode Shift » est encore présent dans les conditions où Shaker K^+ est perméable (A359C). Cette approche nous a permis de montrer que le « Mode Shift » disparaît même avec les mutations conductrices I384N et F484G, supportant les conclusions observées par les courants de « gating ». Ainsi, il est évident que la cause primaire n'est pas reliée à l'inactivation continue de type C causée par la mutation W434F.

Il semble donc que le changement de conformation se produisant dans la région de couplage durant la stabilisation de l'état ouvert est déterminant pour inciter le « Mode Shift ». En revanche, le « Mode Shift » fut aussi observé dans la protéine Ci-VSP. Même

lorsque le domaine enzymatique est clivé, la séparation de la relation Q-V pour différents potentiels de maintien est observée. Villalba-Galea et al. ont suggéré que l'état « relaxé » est causé par une transition de conformation du segment S4 d'une hélice 3_{10} à une hélice- α . Sachant que le domaine central n'est pas présent (le poids mécanique) et que le mécanisme existe encore, cela ne peut être relié qu'à une conformation due au senseur de voltage. Alors, comment expliquer cette nuance?

Nous proposons que le changement interne associé à la transition du segment S4 entre son état relaxé et son état actif, ainsi que le « mode shift » induit par le « poids mécanique » du pore, partagent le même mécanisme. Nous nous basons sur le fait que le changement de conformation lent relié à la relaxation du senseur de voltage dans le segment S4 de HCN et de Ci-VSP a été aussi observé, par l'intermédiaire de mesure de fluorescence en voltage imposé, dans Shaker IR-A359C. En absence du pore, la corrélation du changement de fluorescence en fonction de la constante de temps pour accéder le « Mode Shift » n'est pas observée. Ceci indique que le découplage empêche, ou ralentit significativement, le changement de conformation de S4 ainsi que l'accès au « Mode shift ». En d'autres termes, le pore influence de façon allostérique le senseur de voltage et sa conformation.

4.3.2.1. Perspectives

Pour approfondir cette étude, l'élimination du domaine du pore ainsi que du domaine de tétramérisation permettront de déterminer rigoureusement le comportement énergétique et cinétique du senseur de voltage en l'absence de pore. D'ailleurs, cette construction nous permettra de comparer le mécanisme relié au « Mode Shift » entre les mutations de découplage et le senseur de voltage isolé. Avec une telle construction nous pourrions déterminer le taux de transition pour accéder à l'état relaxé en variant le potentiel de maintien pour différentes dépolarisation. D'ailleurs cela nous fournira le déplacement de la Q-V en fonction de potentiel de maintien. Cette approche a déjà été initiée, mais avec difficulté. Isoler le senseur de voltage d'un canal Kv est un processus très complexe.

La nouvelle stabilisation du senseur de voltage obtenue lors du découplage est interprétée par la présence d'un « OFFSET » beaucoup plus rapide que celui de W434F, suggérant que l'état est beaucoup moins stable dans l'état activé que celui de W434F. Toutefois, il est encore présent. Nous avons suggéré qu'il n'est pas relié à l'interaction RELY puisque, comme nous allons le voir dans la section suivante, le découplage est dominant sur la coopérativité. Pour étudier ce phénomène, il faudrait comparer la cinétique du « gating » du mutant découplé à celle de Ci-VSP, où cette composante est aussi présente. Des mutations dans la région N-terminal de S4-5L permettront d'identifier l'interaction responsable de cette composante lente.

4.3.2.2. Conclusion

Cette étude nous a dévoilé que l'implication du « Mode Shift » est essentielle dans le rôle physiologique des canaux de type Kv. Le « Mode shift » aurait comme rôle d'empêcher les canaux de fermer trop rapidement après une dépolarisation: sans celui-ci, les canaux Kv seraient déjà fermés lorsque le potentiel membranaire revient à une différence de potentiel proche de -50 mV. Cela pourrait engendrer une augmentation de la fréquence d'ouverture et causé une arythmie. Toutefois, si les canaux Kv suivent toujours la relation découplée QV0, les canaux potassiques resteront partiellement ouverts à son potentiel de repos. Cela produirait un courant de fuite et une hyperpolarisation de la cellule, mais plus important il empêcherait le développement d'un potentiel d'action. Le mécanisme relié au « Mode Shift » est donc crucial au bon fonctionnement des canaux potassiques voltage dépendants.

4.4. Hypothèse globale

Les conclusions précédentes renforcent notre compréhension du mécanisme moléculaire régissant le couplage électromécanique des canaux potassique à voltage dépendant. Nous avons élucidé deux comportements très controversés dans le domaine des canaux Kv. D'une part, l'article de Batulan et al. identifie l'interaction RELY, gouvernant la stabilisation de l'état ouvert, comme le mécanisme du couplage coopératif entre les différentes sous-unités. D'autre part, Haddad et Blunck 2010 démontrent que

l'interaction S4-5L et S6 intrasous-unitaire est prépondérante dans le couplage électromécanique et que l'élimination du « poids mécanique » établi par le pore sur le senseur aboli le « Mode Shift » puis développe un nouvel état stabilisé pour le senseur de voltage. À cet effet, il en découle que le couplage de pore au senseur n'est pas une interaction « distribuée » sur la totalité du segment S4-5L comme suggéré par (Lu et al., 2001 ; Lu et al., 2002 ; Labro et al., 2008) mais plutôt spécifique, où le lien S4-5L interagit avec le pore en deux endroits localisables. L'un sur le segment S6 de la même sous-unité et l'autre de par une sous-unité voisine. Cette interprétation suggère fortement que le couplage coopératif ainsi qu'électromécanique devraient être étudié en conjonction. En effet, l'altération simultanée des deux comportements distingués (découplage coopératif : Y485A, et découplage mécanique : I384N) des études précédentes pourra spécifier le comportement dominant impliqué entre le pore et le senseur de voltage. Cela pris en considération, la mutation I384N-Y485A-W434F a présenté le même comportement cinétique et énergétique que I384N-W434F suggérant que le couplage électromécanique est un processus qui domine sur l'interaction sous-unitaire advenant de la coopérativité (Y485A) (Figure 4.3).

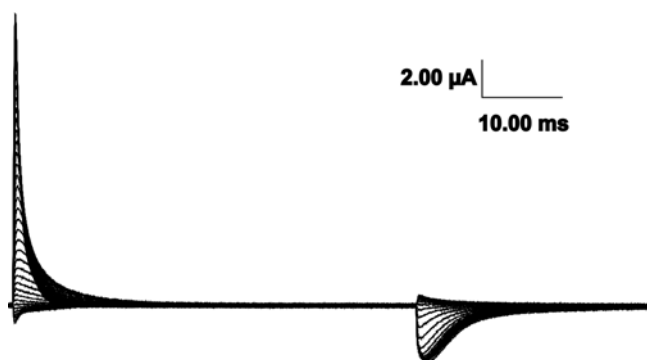


Figure 4. 3. I384N-Y485A-W434F, courant de « gating ».

Il est clair que cette approche « réductionniste » simplifie les étapes nécessaires pour remonter à l'origine du couplage, la translocation du segment S4 (section 1.1). Afin de déterminer les événements précédents le mécanisme associé spécifiquement au couplage inter- et intra-sousunitaire, on doit déterminer les autres interactions moléculaires qui gouvernent la continuité du couplage électromécanique. Alors, l'isolation des composantes dominantes de chaque étape permettra d'approfondir notre compréhension sur le couplage *complet* impliqué entre la sensation du voltage et l'ouverture du pore conducteur.

Une propriété importante qui nécessite une plus grande attention afin de comprendre le couplage est l'élasticité énergétique. Ce processus est illustré par le décalage entre la relation Q-V et G-V dans le type sauvage (Figure 1.29). Il a été suggéré que ce décalage est influencé par la composition et la grandeur du lien S4-5L reliant le port au senseur (référence). Donc, il se peut que cette transition découle d'une déformation que le segment S4-5L entreprend durant son mouvement. Cette idée est appuyée par le fait que le segment S4-5L a une flexibilité résultant des glycines qui le composent (G381-G386-G397). Ainsi, l'intégration d'un acide aminé qui renforce la rigidité, disons une alanine ou une proline, entrainera une perte dans la malléabilité de l'angle entre S4 et S4-5L. Cette interprétation correspond à des conclusions déjà suggérées par le travail de Barreto et al, qui sont présentement en préparation. Une conclusion plus approfondie de cette étude permettra d'en comprendre encore plus sur couplage électromécanique.

Précédent l'ouverture du pore, le senseur de voltage subit deux transitions durant le mouvement de S4 entre l'état au repos et l'état activé (Bezanilla 2000). Tout d'abord, la partie externe du senseur de voltage bouge indépendamment vers l'extérieur transportant la plupart des charges de « gating », suivi d'une deuxième transition que le segment S4 interne subit (Figure 4.4). D'après la structure cristalline Kv1.2 (Long et al., 2005 ; Chen et al., 2010), durant la seconde transition le senseur de voltage devrait s'éloigner du pore central vers la « vallée » formée par les segments S1-S3. Ce mouvement est probablement instigateur d'une interaction électrostatique entre les segments S2 (E293, R297), S3(D316) et le segment S4(R377) au niveau interne de la crevasse intracellulaire. Selon certains résultats non publiés (Petitjean, Haddad et Blunck (en préparation)), il est très probable que ce soit ces interactions qui stabilisent le senseur de voltage dans son état activé et qui donne lieu à la composante lente observée dans le « OFF-gating » de ces mutants découplant (I384N, F484G ; Figure 4.3). Cela reste à être vérifié. D'ailleurs, pour le cas du type sauvage, cette interaction suggérée par S1-S3 est contrebalancée par le « poids mécanique » du pore qui a comme rôle de ramener le senseur de voltage dans son état de repos. C'est pour cette raison que la composante lente observée dans les mutants F484G, I384N et le type sauvage (W434F) est absente dans le mutant Y485A.

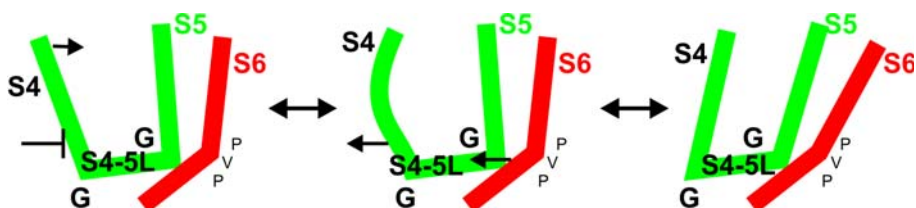


Figure 4.4. Interaction Baretto et al. En préparation.

Le modèle représentant le déplacement de S4. Le premier mouvement est transporté par la partie externe. Le deuxième mouvement inclus la translation de S4-5L et modifie l'angle entre S4 et S4-5L.

Compte tenu de ce qui précède et de ce que le modèle minimaliste présenté par Batulan et al. suggère, on propose l'hypothèse globale. L'acheminement des événements impliqués dans le couplage électromécanique complet se décortique comme suit. Après la première transition, le mouvement interne du segment S4 tire sur S4-5L, où les glycines dans le terminal de S4-5L agissent comme une liaison pivot (charnière) pour le segment S4 (Figure 4.5) (Sandra et al. en préparation). Ensuite, la troisième transition est l'ensemble du mouvement reliant le segment S4-5L avec S5. Ce mouvement est couplé à son tour par l'interaction S4-5L et S6 (I384 et F484) (Haddad et al., 2010). L'ouverture du pore se produit durant la quatrième transition due à l'interaction entre le groupement OH de Y485 avec R394-E395 sur la sous-unité adjacente (Transition 4). De là, la coopérativité entre les sous-unités est introduite. Finalement, l'état ouvert est stabilisé par l'interaction Y485 et ses partenaires (Transition 5) (Batulan et al., 2010).

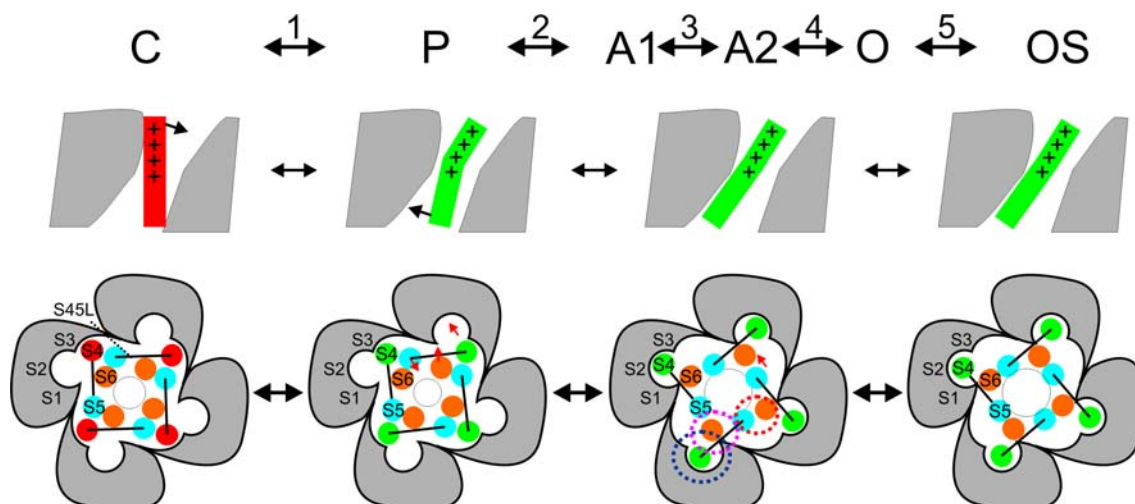


Figure 4.5. Modèle cinétique

L'illustration montre le modèle du senseur de voltage sous deux angles. En haut, une vue de côté, et en bas une vue du bas. Le modèle cinétique décrit les transitions de 1 à 5. Transition 1: L'activation du segment S4 externe amène la partie interne de S4 dans un état P (permissif). Transition 2: déformation du segment S4 interne à cause des charges situés dans la partie intracellulaire de S4, S1, S2 and S3. Transition 3: S45L bouge en s'éloignant du pore (I384-F484). Transition 4: L'ouverture du canal par l'interaction à longue portée de Y485. Transition 5: stabilisation de l'état ouvert par Y485-E395/R394.

Toutes ces transitions sont purement basées sur les états énergétiques du canal. Ceci ne veut rien dire de leurs évolutions temporelles. En d'autres termes, certaines transitions peuvent survenir simultanément telle que celles qui sont doublement connectées au segment S4-5L, l'une avec la même sous-unité (I384, F484) et l'autre avec une autre sous-unité (Y485, R394, E395). En éclaircissant le rôle de chaque interaction, il serait finalement possible de décortiquer les étapes impliquant les interactions fondamentales du senseur de voltage durant son évolution *temporelle* pour ouvrir le pore (Haddad et al, en préparation).

5. Conclusion.

Les canaux potassiques voltage-dépendant ont un rôle fondamental dans la physiologie du système nerveux. Il est par ailleurs avéré que des anomalies dans leurs gènes peuvent mener à des maladies héréditaires très sévères telles que l'ataxie épisodique de type 1 (Imbrici, D'Adamo *et al.*, 2006; Rajakulendran, Schorge *et al.*, 2007) et certaines

arythmies (Mannikko, Pandey *et al.*, 2005; Bruening-Wright, Elinder *et al.*, 2007; Bruening-Wright et Larsson, 2007). Il n'est donc pas étonnant que l'étude de la relation structure-fonction des canaux Kv fasse l'objet de recherche en biophysique. Les mesures de courant de « gating » (Bezanilla et Armstrong, 1974) accompagnées des méthodes de fluorométrie en prenant comme référence la structure cristalline de Kv1.2 (Long, 2005a), ont permis de comprendre comment le mouvement du senseur de voltage est couplé à l'ouverture du pore. En premier lieu, nous avons démontré le rôle physiologique de l'interaction entre le lien S4-S5 d'une sous-unité et le segment S6 de la sous-unité adjacente. Nous avons établi que l'interaction inter sous-unitaire RELY stabilise l'état ouvert des canaux Kv et donne lieu à la composante lente du « OFF-gating ». En second lieu, nous avons montré que le couplage électromécanique entre des pores et les senseurs de voltage est nécessaire pour que le « mode shift » existe. Les résultats obtenus sont applicables à d'autres canaux ioniques voltage-dépendants tel que HCN (Decher, Chen *et al.*, 2004), les canaux HERG (Tristani-Firouzi, Chen *et al.*, 2002), ainsi que ceux plus récemment suggéré tel que les canaux sodiques voltage-dépendants Nav (Muroi, Arcisio-Miranda *et al.*, 2010).

Ainsi donc, l'influence mutuelle entre le senseur et le domaine du pore semble s'appliquer universellement à un large assortiment de canaux ioniques à voltage-dépendants de par le contrôle de fonctions telles que la fréquence du potentiel d'action et la récupération après une excitation (Mannikko, Pandey *et al.*, 2005; Bruening-Wright, Elinder *et al.*, 2007). En guise de conclusion, ces résultats ont éclairci le processus de fonctionnement du couplage électromécanique et nous a permis d'introduire une hypothèse pour entreprendre une recherche sur les étapes qui précèdent le couplage coopératif et électromécanique. En résumé, nous pouvons maintenant orienter notre recherche vers l'élasticité du segment S4-5L pour ensuite étudier l'interaction électrostatique entre la crevasse interne et le terminal C du senseur de voltage (S4) et possiblement élucider de quelle manière le système emmagasine son énergie.

6. Bibliographie

Adams, M. D. (2000). "The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*." Science **287**(5461): 2185-2195.

Aggarwal, S. K. and R. MacKinnon (1996). "Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker K⁺ channel." Neuron **16**(6): 1169-1177.

Ahern, C. A. and R. Horn (2004). "Stirring up controversy with a voltage sensor paddle." Trends Neurosci **27**(6): 303-307.

Ahern, C. A. and R. Horn (2005). "Focused electric field across the voltage sensor of potassium channels." Neuron **48**(1): 25-29.

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**(5): 553-575.

Armstrong, C. M. (1981). "Sodium channels and gating currents." Physiol Rev **61**(3): 644-683.

Armstrong, C. M. (2003). "Voltage-gated K channels." Sci STKE **2003**(188): re10.

Asamoah, O. K., J. P. Wuskell, et al. (2003). "A fluorometric approach to local electric field measurements in a voltage-gated ion channel." Neuron **37**(1): 85-97.

Baker, O. S., H. P. Larsson, et al. (1998). "Three transmembrane conformations and sequence-dependent displacement of the S4 domain in shaker K⁺ channel gating." Neuron **20**(6): 1283-1294.

Berliner, L. J. (1983). "The spin-label approach to labeling membrane protein sulfhydryl groups." Ann N Y Acad Sci **414**: 153-161.

Berneche, S. and B. Roux (2001). "Energetics of ion conduction through the K⁺ channel." Nature **414**(6859): 73-77.

Bezanilla, F. (1982). "Gating charge movements and kinetics of excitable membrane proteins." Prog Clin Biol Res **79**: 3-16.

Bezanilla, F. (2000). "The voltage sensor in voltage-dependent ion channels." Physiol Rev **80**(2): 555-592.

Bezanilla, F. (2005). "The voltage-sensor structure in a voltage-gated channel." Trends Biochem Sci **30**(4): 166-168.

Bezanilla, F. (2008). "How membrane proteins sense voltage." Nature Reviews Molecular Cell Biology **9**(4): 323-332.

Bezanilla, F. and C. M. Armstrong (1974). "Gating currents of the sodium channels: three ways to block them." Science **183**(126): 753-754.

Bezanilla, F. and C. M. Armstrong (1977). "Inactivation of the sodium channel. I. Sodium current experiments." J Gen Physiol **70**(5): 549-566.

Bezanilla, F. and E. Perozo (2002). "Structural biology. Force and voltage sensors in one structure." Science **298**(5598): 1562-1563.

Bezanilla, F., E. Perozo, et al. (1994). "Gating of Shaker K⁺ channels: II. The components of gating currents and a model of channel activation." Biophys J **66**(4): 1011-1021.

Bezanilla, F. and E. Stefani (1994). "Voltage-dependent gating of ionic channels." Annu Rev Biophys Biomol Struct **23**: 819-846.

Blaustein, R. O. and C. Miller (2004). "Ion channels: shake, rattle or roll?" Nature **427**(6974): 499-500.

Blunck, R., J. F. Cordero-Morales, et al. (2006). "Detection of the Opening of the Bundle Crossing in KcsA with Fluorescence Lifetime Spectroscopy Reveals the Existence of Two Gates for Ion Conduction." The Journal of General Physiology **128**(5): 569-581.

Blunck, R., D. M. Starace, et al. (2004). "Detecting rearrangements of shaker and NaChBac in real-time with fluorescence spectroscopy in patch-clamped mammalian cells." Biophys J **86**(6): 3966-3980.

Börjesson, S. I. and F. Elinder (2008). "Structure, Function, and Modification of the Voltage Sensor in Voltage-Gated Ion Channels." Cell Biochemistry and Biophysics **52**(3): 149-174.

Broomand, A. and F. Elinder (2008). "Large-Scale Movement within the Voltage-Sensor Paddle of a Potassium Channel—Support for a Helical-Screw Motion." Neuron **59**(5): 770-777.

Broomand, A., R. Mannikko, et al. (2003). "Molecular movement of the voltage sensor in a K channel." J Gen Physiol **122**(6): 741-748.

Bruening-Wright, A., F. Elinder, et al. (2007). "Kinetic relationship between the voltage sensor and the activation gate in spHCN channels." J Gen Physiol **130**(1): 71-81.

Bruening-Wright, A. and H. P. Larsson (2007). "Slow conformational changes of the voltage sensor during the mode shift in hyperpolarization-activated cyclic-nucleotide-gated channels." J Neurosci **27**(2): 270-278.

Brum, G., E. Stefani, et al. (1987). "Simultaneous measurements of Ca²⁺ currents and intracellular Ca²⁺ concentrations in single skeletal muscle fibers of the frog." Can J Physiol Pharmacol **65**(4): 681-685.

Campos, F. V., B. Chanda, et al. (2007). "Two atomic constraints unambiguously position the S4 segment relative to S1 and S2 segments in the closed state of Shaker K channel." Proceedings of the National Academy of Sciences **104**(19): 7904-7909.

Cannon, S. C. (2010). "Voltage-sensor mutations in channelopathies of skeletal muscle." The Journal of Physiology **588**(11): 1887-1895.

Caprini, M., M. Fava, et al. (2005). "Molecular compatibility of the channel gate and the N terminus of S5 segment for voltage-gated channel activity." J Biol Chem **280**(18): 18253-18264.

Catterall, W. A. (1986). "Molecular properties of voltage-sensitive sodium channels." Annu Rev Biochem **55**: 953-985.

Catterall, W. A. (2010). "Ion Channel Voltage Sensors: Structure, Function, and Pathophysiology." Neuron **67**(6): 915-928.

Cha, A. and F. Bezanilla (1997). "Characterizing voltage-dependent conformational changes in the Shaker K⁺ channel with fluorescence." Neuron **19**(5): 1127-1140.

Cha, A. and F. Bezanilla (1998). "Structural implications of fluorescence quenching in the Shaker K⁺ channel." J Gen Physiol **112**(4): 391-408.

Cha, A., G. E. Snyder, et al. (1999). "Atomic scale movement of the voltage-sensing region in a potassium channel measured via spectroscopy." Nature **402**(6763): 809-813.

Cha, A., N. Zerangue, et al. (1998). "Fluorescence techniques for studying cloned channels and transporters expressed in *Xenopus* oocytes." Methods Enzymol **296**: 566-578.

Chakrapani, S., J. F. Cordero-Morales, et al. (2007a). "A Quantitative Description of KcsA Gating I: Macroscopic Currents." The Journal of General Physiology **130**(5): 465-478.

Chakrapani, S., J. F. Cordero-Morales, et al. (2007b). "A Quantitative Description of KcsA Gating II: Single-Channel Currents." The Journal of General Physiology **130**(5): 479-496.

Chakrapani, S. and E. Perozo (2007). "How to gate an ion channel: lessons from MthK." Nat Struct Mol Biol **14**(3): 180-182.

Chanda, B., O. K. Asamoah, et al. (2005). "Gating charge displacement in voltage-gated ion channels involves limited transmembrane movement." Nature **436**(7052): 852-856.

Chen, F. S., D. Steele, et al. (1997). "Allosteric effects of permeating cations on gating currents during K⁺ channel deactivation." J Gen Physiol **110**(2): 87-100.

Chen, J. (2001). "The S4-S5 linker couples voltage sensing and activation of pacemaker channels." Proceedings of the National Academy of Sciences **98**(20): 11277-11282.

Chen, L. and M. F. Roberts (2000). "Overexpression, purification, and analysis of complementation behavior of E. coli SuhB protein: comparison with bacterial and archaeal inositol monophosphatases." Biochemistry **39**(14): 4145-4153.

Chen, X., Q. Wang, et al. (2010). "Structure of the full-length Shaker potassium channel Kv1.2 by normal-mode-based X-ray crystallographic refinement." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(25): 11352-11357.

Choe, S. (2002). "Potassium channel structures." Nat Rev Neurosci **3**(2): 115-121.

Clayton, G. M., S. Altieri, et al. (2008). "Structure of the transmembrane regions of a bacterial cyclic nucleotide-regulated channel." Proceedings of the National Academy of Sciences **105**(5): 1511-1515.

Cohen, B. E., M. Grabe, et al. (2003). "Answers and questions from the KvAP structures." Neuron **39**(3): 395-400.

Cole, K. S. and J. W. Moore (1960). "Potassium ion current in the squid giant axon: dynamic characteristic." Biophys J **1**: 1-14.

Colquhoun, D. and A. G. Hawkes (1977). "Relaxation and fluctuations of membrane currents that flow through drug-operated channels." Proc R Soc Lond B Biol Sci **199**(1135): 231-262.

Colquhoun, D. and A. G. Hawkes (1982). "On the stochastic properties of bursts of single ion channel openings and of clusters of bursts." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **300**(1098): 1-59.

Colquhoun, D. and A. G. Hawkes (1995). "Desensitization of N-methyl-D-aspartate receptors: a problem of interpretation." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(22): 10327-10329.

Conti, F., L. J. De Felice, et al. (1975). "Potassium and sodium ion current noise in the membrane of the squid giant axon." J Physiol **248**(1): 45-82.

Coquiere, D., A. de la Lande, et al. (2009). "Multipoint molecular recognition within a calix[6]arene funnel complex." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **106**(26): 10449-10454.

Cordero-Morales, J. F., L. G. Cuello, et al. (2006a). "Voltage-dependent gating at the KcsA selectivity filter." Nature Structural & Molecular Biology **13**(4): 319-322.

Cordero-Morales, J. F., L. G. Cuello, et al. (2006b). "Molecular determinants of gating at the potassium-channel selectivity filter." Nature Structural & Molecular Biology **13**(4): 311-318.

Cuello, L. G. (2004). "Molecular Architecture of the KvAP Voltage-Dependent K⁺ Channel in a Lipid Bilayer." Science **306**(5695): 491-495.

Cuello, L. G., V. Jogini, et al. (2010). "Structural mechanism of C-type inactivation in K⁺ channels." Nature **466**(7303): 203-208.

Cuello, L. G., J. G. Romero, et al. (1998). "pH-dependent gating in the Streptomyces lividans K⁺ channel." Biochemistry **37**(10): 3229-3236.

Debanne, D., N. C. Guerineau, et al. (1997). "Action-potential propagation gated by an axonal I(A)-like K⁺ conductance in hippocampus." Nature **389**(6648): 286-289.

Decher, N. (2004). "Voltage-dependent Gating of Hyperpolarization-activated, Cyclic Nucleotide-gated Pacemaker Channels: MOLECULAR COUPLING BETWEEN THE S4-S5 AND C-LINKERS." Journal of Biological Chemistry **279**(14): 13859-13865.

Decher, N., J. Chen, et al. (2004). "Voltage-dependent gating of hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated pacemaker channels: molecular coupling between the S4-S5 and C-linkers." J Biol Chem **279**(14): 13859-13865.

Demo, S. D. and G. Yellen (1991). "The inactivation gate of the Shaker K⁺ channel behaves like an open-channel blocker." Neuron **7**(5): 743-753.

Diaspro, A. (2006). "Shine on ... proteins." Microsc Res Tech **69**(3): 149-151.

Doyle, D. A. (1998). "The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K⁺ Conduction and Selectivity." Science **280**(5360): 69-77.

Durell, S. R., Y. Hao, et al. (1998). "Structural models of the transmembrane region of voltage-gated and other K⁺ channels in open, closed, and inactivated conformations." J Struct Biol **121**(2): 263-284.

Durell, S. R., I. H. Shrivastava, et al. (2004). "Models of the structure and voltage-gating mechanism of the shaker K⁺ channel." Biophys J **87**(4): 2116-2130.

Elinder, F. and P. Arhem (2003). "Metal ion effects on ion channel gating." Q Rev Biophys **36**(4): 373-427.

Elinder, F., R. Mannikko, et al. (2001). "S4 charges move close to residues in the pore domain during activation in a K channel." J Gen Physiol **118**(1): 1-10.

Elliott, D. J., E. J. Neale, et al. (2004). "Molecular mechanism of voltage sensor movements in a potassium channel." EMBO J **23**(24): 4717-4726.

Fedida, D., R. Bouchard, et al. (1996). "Slow gating charge immobilization in the human potassium channel Kv1.5 and its prevention by 4-aminopyridine." J Physiol **494** (Pt 2): 377-387.

Gagnon, D. G. and F. Bezanilla (2009). "A single charged voltage sensor is capable of gating the Shaker K⁺ channel." The Journal of General Physiology **133**(5): 467-483.

Gagnon, D. G. and F. Bezanilla (2010). "The contribution of individual subunits to the coupling of the voltage sensor to pore opening in Shaker K channels: effect of ILT mutations in heterotetramers." J Gen Physiol **136**(5): 555-568.

Gandhi, C. S. (2002). "Molecular Models of Voltage Sensing." The Journal of General Physiology **120**(4): 455-463.

Gandhi, C. S., E. Clark, et al. (2003). "The orientation and molecular movement of a k(+) channel voltage-sensing domain." Neuron **40**(3): 515-525.

Gautam, M. and M. A. Tanouye (1990). "Alteration of potassium channel gating: molecular analysis of the Drosophila Sh5 mutation." Neuron **5**(1): 67-73.

Glauner, K. S., L. M. Mannuzzu, et al. (1999). "Spectroscopic mapping of voltage sensor movement in the Shaker potassium channel." Nature **402**(6763): 813-817.

Gola, M. and G. Romey (1971). "[Anomalous responses to subthreshold currents of certain somatic membranes (giant neurons of Helix pomatia). Voltage clamp analysis]." Pflugers Arch **327**(2): 105-131.

Goldstein, S. A. (1996). "A structural vignette common to voltage sensors and conduction pores: canaliculi." Neuron **16**(4): 717-722.

Gonzalez-Perez, V., K. Stack, et al. (2010). "Reduced voltage sensitivity in a K⁺-channel voltage sensor by electric field remodeling." Proceedings of the National Academy of Sciences **107**(11): 5178-5183.

Gutman, G. A. (2005). "International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and Molecular Relationships of Voltage-Gated Potassium Channels." Pharmacological Reviews **57**(4): 473-508.

Guy, H. R. and P. Seetharamulu (1986). "Molecular model of the action potential sodium channel." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(2): 508-512.

Hackos, D. H., T. H. Chang, et al. (2002). "Scanning the intracellular S6 activation gate in the shaker K⁺ channel." J Gen Physiol **119**(6): 521-532.

Hamill, O. P., A. Marty, et al. (1981). "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches." Pflugers Arch **391**(2): 85-100.

Heginbotham, L., T. Abramson, et al. (1992). "A functional connection between the pores of distantly related ion channels as revealed by mutant K⁺ channels." Science **258**(5085): 1152-1155.

Heginbotham, L., M. LeMasurier, et al. (1999). "Single streptomyces lividans K(+) channels: functional asymmetries and sidedness of proton activation." J Gen Physiol **114**(4): 551-560.

Heginbotham, L., Z. Lu, et al. (1994). "Mutations in the K⁺ channel signature sequence." Biophys J **66**(4): 1061-1067.

Hodgkin, A. L. and A. F. Huxley (1952a). "The components of membrane conductance in the giant axon of Loligo." J Physiol **116**(4): 473-496.

Hodgkin, A. L. and A. F. Huxley (1952b). "Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo." J Physiol **116**(4): 449-472.

Hodgkin, A. L. and A. F. Huxley (1952c). "Movement of sodium and potassium ions during nervous activity." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **17**: 43-52.

Hodgkin, A. L. and A. F. Huxley (1952d). "Propagation of electrical signals along giant nerve fibers." Proc R Soc Lond B Biol Sci **140**(899): 177-183.

Hodgkin, A. L. and A. F. Huxley (1952e). "A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve." J Physiol **117**(4): 500-544.

Hodgkin, A. L., A. F. Huxley, et al. (1952). "Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of Loligo." J Physiol **116**(4): 424-448.

Hoffman, D. A., J. C. Magee, et al. (1997). "K⁺ channel regulation of signal propagation in dendrites of hippocampal pyramidal neurons." Nature **387**(6636): 869-875.

Hoshi, T., W. N. Zagotta, et al. (1990). "Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation." Science **250**(4980): 533-538.

Imbrici, P., M. C. D'Adamo, et al. (2006). "Episodic ataxia type 1 mutations in the KCNA1 gene impair the fast inactivation properties of the human potassium channels Kv1.4-1.1/Kvbeta1.1 and Kv1.4-1.1/Kvbeta1.2." Eur J Neurosci **24**(11): 3073-3083.

Isacoff, E. Y., Y. N. Jan, et al. (1991). "Putative receptor for the cytoplasmic inactivation gate in the Shaker K⁺ channel." Nature **353**(6339): 86-90.

Islas, L. D. and F. J. Sigworth (2001). "Electrostatics and the gating pore of Shaker potassium channels." J Gen Physiol **117**(1): 69-89.

Iverson, L. E., M. A. Tanouye, et al. (1988). "A-type potassium channels expressed from Shaker locus cDNA." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(15): 5723-5727.

Jiang, Y., A. Lee, et al. (2002). "Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel." Nature **417**(6888): 515-522.

Jiang, Y., A. Lee, et al. (2003). "X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel." Nature **423**(6935): 33-41.

Jogini, V. and B. Roux (2007). "Dynamics of the Kv1.2 Voltage-Gated K⁺ Channel in a Membrane Environment☆." Biophysical Journal **93**(9): 3070-3082.

Kamb, A., L. E. Iverson, et al. (1987). "Molecular characterization of Shaker, a Drosophila gene that encodes a potassium channel." Cell **50**(3): 405-413.

Kamb, A., J. Tseng-Crank, et al. (1988). "Multiple products of the Drosophila Shaker gene may contribute to potassium channel diversity." Neuron **1**(5): 421-430.

Kanevsky, M. and R. W. Aldrich (1999). "Determinants of voltage-dependent gating and open-state stability in the S5 segment of Shaker potassium channels." J Gen Physiol **114**(2): 215-242.

Keynes, R. D. and F. Elinder (1999). "The screw-helical voltage gating of ion channels." Proc Biol Sci **266**(1421): 843-852.

Khalili-Araghi, F., V. Jogini, et al. (2010). "Calculation of the Gating Charge for the Kv1.2 Voltage-Activated Potassium Channel." Biophysical Journal **98**(10): 2189-2198.

Kohout, S. C., S. C. Bell, et al. (2010). "Electrochemical coupling in the voltage-dependent phosphatase Ci-VSP." Nature Chemical Biology **6**(5): 369-375.

Kozak, M. (1991). "Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation." J Biol Chem **266**(30): 19867-19870.

Kubo, Y., E. Reuveny, et al. (1993). "Primary structure and functional expression of a rat G-protein-coupled muscarinic potassium channel." Nature **364**(6440): 802-806.

Kumanovics, A., G. Levin, et al. (2002). "Family ties of gated pores: evolution of the sensor module." FASEB J **16**(12): 1623-1629.

Kurata, H. T., G. S. Soon, et al. (2002). "Amino-terminal determinants of U-type inactivation of voltage-gated K⁺ channels." J Biol Chem **277**(32): 29045-29053.

Kuzmenkin, A. (2004). "Gating of the Bacterial Sodium Channel, NaChBac: Voltage-dependent Charge Movement and Gating Currents." The Journal of General Physiology **124**(4): 349-356.

Labro, A. J., A. L. Raes, et al. (2008). "Kv Channel Gating Requires a Compatible S4-S5 Linker and Bottom Part of S6, Constrained by Non-interacting Residues." The Journal of General Physiology **132**(6): 667-680.

Lainé, M., M.-c. A. Lin, et al. (2003). "Atomic Proximity between S4 Segment and Pore Domain in Shaker Potassium Channels." Neuron **39**(3): 467-481.

Larsson, H. P., O. S. Baker, et al. (1996). "Transmembrane movement of the shaker K⁺ channel S4." Neuron **16**(2): 387-397.

Lecar, H., H. P. Larsson, et al. (2003). "Electrostatic model of S4 motion in voltage-gated ion channels." Biophys J **85**(5): 2854-2864.

Ledwell, J. L. and R. W. Aldrich (1999). "Mutations in the S4 region isolate the final voltage-dependent cooperative step in potassium channel activation." J Gen Physiol **113**(3): 389-414.

Lee, S. Y. (2005). "Structure of the KvAP voltage-dependent K⁺ channel and its dependence on the lipid membrane." Proceedings of the National Academy of Sciences **102**(43): 15441-15446.

Li-Smerin, Y., D. H. Hackos, et al. (2000). "alpha-helical structural elements within the voltage-sensing domains of a K(+) channel." J Gen Physiol **115**(1): 33-50.

Lichtinghagen, R., M. Stocker, et al. (1990). "Molecular basis of altered excitability in Shaker mutants of *Drosophila melanogaster*." EMBO J **9**(13): 4399-4407.

Liu, Y., M. Holmgren, et al. (1997). "Gated access to the pore of a voltage-dependent K⁺ channel." Neuron **19**(1): 175-184.

Llano, I., C. K. Webb, et al. (1988). "Potassium conductance of the squid giant axon. Single-channel studies." J Gen Physiol **92**(2): 179-196.

Loboda, A. and C. M. Armstrong (2001). "Resolving the gating charge movement associated with late transitions in K channel activation." Biophys J **81**(2): 905-916.

Long, S. B. (2005a). "Crystal Structure of a Mammalian Voltage-Dependent Shaker Family K⁺ Channel." Science **309**(5736): 897-903.

Long, S. B. (2005b). "Voltage Sensor of Kv1.2: Structural Basis of Electromechanical Coupling." Science **309**(5736): 903-908.

Long, S. B., X. Tao, et al. (2007). "Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment." Nature **450**(7168): 376-382.

Lu, Z. (2002). "Coupling between Voltage Sensors and Activation Gate in Voltage-gated K⁺ Channels." The Journal of General Physiology **120**(5): 663-676.

Lu, Z., A. M. Klem, et al. (2001). "Ion conduction pore is conserved among potassium channels." Nature **413**(6858): 809-813.

Mannikko, R., S. Pandey, et al. (2005). "Hysteresis in the voltage dependence of HCN channels: conversion between two modes affects pacemaker properties." J Gen Physiol **125**(3): 305-326.

Mannuzzu, L. M., M. M. Moronne, et al. (1996). "Direct physical measure of conformational rearrangement underlying potassium channel gating." Science **271**(5246): 213-216.

Marme, N., J. P. Knemeyer, et al. (2003). "Inter- and intramolecular fluorescence quenching of organic dyes by tryptophan." Bioconjug Chem **14**(6): 1133-1139.

Mazucca, M. and F. Lesage (2007). "Canaux potassiques, maladies héréditaires et acquises." La Revue de Médecine Interne **28**(8): 576-579.

McCormack, K., M. A. Tanouye, et al. (1991). "A role for hydrophobic residues in the voltage-dependent gating of Shaker K⁺ channels." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(7): 2931-2935.

Meuser, D., H. Splitt, et al. (1999). "Exploring the open pore of the potassium channel from *Streptomyces lividans*." FEBS Lett **462**(3): 447-452.

Milescu, M., F. Bosmans, et al. (2009). "Interactions between lipids and voltage sensor paddles detected with tarantula toxins." Nature Structural & Molecular Biology **16**(10): 1080-1085.

Morais-Cabral, J. H., Y. Zhou, et al. (2001). "Energetic optimization of ion conduction rate by the K⁺ selectivity filter." Nature **414**(6859): 37-42.

Morin, T. J. and W. R. Kobertz (2008). "Tethering Chemistry and K⁺ Channels." Journal of Biological Chemistry **283**(37): 25105-25109.

Murata, Y., H. Iwasaki, et al. (2005). "Phosphoinositide phosphatase activity coupled to an intrinsic voltage sensor." Nature **435**(7046): 1239-1243.

Murata, Y. and Y. Okamura (2007). "Depolarization activates the phosphoinositide phosphatase Ci-VSP, as detected in *Xenopus* oocytes coexpressing sensors of PIP₂." The Journal of Physiology **583**(3): 875-889.

Muroi, Y., M. Arcisio-Miranda, et al. (2010). "Molecular determinants of coupling between the domain III voltage sensor and pore of a sodium channel." Nature Structural & Molecular Biology **17**(2): 230-237.

Neher, E. and B. Sakmann (1976). "Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres." Nature **260**(5554): 799-802.

Norton, R. S., M. W. Pennington, et al. (2004). "Potassium channel blockade by the sea anemone toxin ShK for the treatment of multiple sclerosis and other autoimmune diseases." Curr Med Chem **11**(23): 3041-3052.

Okumura, A., M. Sano, et al. (2007). "Aromatic structure of tyrosine-92 in the extrinsic PsbU protein of red algal photosystem II is important for its functioning." FEBS Lett **581**(27): 5255-5258.

Olcese, R., R. Latorre, et al. (1997). "Correlation between charge movement and ionic current during slow inactivation in Shaker K⁺ channels." J Gen Physiol **110**(5): 579-589.

Olcese, R., D. Sigg, et al. (2001). "A conducting state with properties of a slow inactivated state in a shaker K(+) channel mutant." J Gen Physiol **117**(2): 149-163.

Papazian, D. M., X. M. Shao, et al. (1995). "Electrostatic interactions of S4 voltage sensor in Shaker K⁺ channel." Neuron **14**(6): 1293-1301.

Papazian, D. M., W. R. Silverman, et al. (2002). "Structural organization of the voltage sensor in voltage-dependent potassium channels." Novartis Found Symp **245**: 178-190; discussion 190-172, 261-174.

Papazian, D. M., L. C. Timpe, et al. (1991). "Alteration of voltage-dependence of Shaker potassium channel by mutations in the S4 sequence." Nature **349**(6307): 305-310.

Pathak, M., L. Kurtz, et al. (2005). "The cooperative voltage sensor motion that gates a potassium channel." J Gen Physiol **125**(1): 57-69.

Perozo, E., R. MacKinnon, et al. (1993). "Gating currents from a nonconducting mutant reveal open-closed conformations in Shaker K⁺ channels." Neuron **11**(2): 353-358.

Piper, D. R., A. Varghese, et al. (2003). "Gating currents associated with intramembrane charge displacement in HERG potassium channels." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(18): 10534-10539.

Plant, L. D., S. Rajan, et al. (2005). "K2P channels and their protein partners." Curr Opin Neurobiol **15**(3): 326-333.

Plevin, M. J., D. L. Bryce, et al. (2010). "Direct detection of CH/ π interactions in proteins." Nat Chem **2**(6): 466-471.

Pongs, O., N. Kecskemethy, et al. (1988). "Shaker encodes a family of putative potassium channel proteins in the nervous system of Drosophila." EMBO J **7**(4): 1087-1096.

Posson, D. J., P. Ge, et al. (2005). "Small vertical movement of a K⁺ channel voltage sensor measured with luminescence energy transfer." Nature **436**(7052): 848-851.

Rajakulendran, S., S. Schorge, et al. (2007). "Episodic ataxia type 1: a neuronal potassium channelopathy." Neurotherapeutics **4**(2): 258-266.

Ramsey, J. J. and K. Hagopian (2006). "Energy expenditure and restriction of energy intake: could energy restriction alter energy expenditure in companion animals?" J Nutr **136**(7 Suppl): 1958S-1966S.

- Ramu, Y., Y. Xu, et al. (2006). "Enzymatic activation of voltage-gated potassium channels." Nature **442**(7103): 696-699.
- Roux, B., S. Berneche, et al. (2000). "Ion channels, permeation, and electrostatics: insight into the function of KcsA." Biochemistry **39**(44): 13295-13306.
- Ruppersberg, J. P., R. Frank, et al. (1991). "Cloned neuronal IK(A) channels reopen during recovery from inactivation." Nature **353**(6345): 657-660.
- Ruta, V., J. Chen, et al. (2005). "Calibrated measurement of gating-charge arginine displacement in the KvAP voltage-dependent K⁺ channel." Cell **123**(3): 463-475.
- Salkoff, L., A. D. Wei, et al. (2005). "Potassium channels in *C. elegans*." WormBook: 1-15.
- Sanguinetti, M. C. and Q. P. Xu (1999). "Mutations of the S4-S5 linker alter activation properties of HERG potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes." J Physiol **514** (Pt 3): 667-675.
- Sasaki, M. (2006). "A Voltage Sensor-Domain Protein Is a Voltage-Gated Proton Channel." Science **312**(5773): 589-592.
- Schmidt, D., Q.-X. Jiang, et al. (2006). "Phospholipids and the origin of cationic gating charges in voltage sensors." Nature **444**(7120): 775-779.
- Schönherr, R., L. M. Mannuzzu, et al. (2002). "Conformational switch between slow and fast gating modes: allosteric regulation of voltage sensor mobility in the EAG K⁺ channel." Neuron **35**(5): 935-949.
- Schoppa, N. E., K. McCormack, et al. (1992). "The size of gating charge in wild-type and mutant Shaker potassium channels." Science **255**(5052): 1712-1715.
- Schoppa, N. E. and F. J. Sigworth (1998a). "Activation of shaker potassium channels. I. Characterization of voltage-dependent transitions." J Gen Physiol **111**(2): 271-294.
- Schoppa, N. E. and F. J. Sigworth (1998b). "Activation of Shaker potassium channels. II. Kinetics of the V2 mutant channel." J Gen Physiol **111**(2): 295-311.
- Schrempf, H., O. Schmidt, et al. (1995). "A prokaryotic potassium ion channel with two predicted transmembrane segments from *Streptomyces lividans*." EMBO J **14**(21): 5170-5178.

Schwarz, W. and Q. B. Gu (1988). "Characteristics of the Na⁺/K⁺-ATPase from *Torpedo californica* expressed in *Xenopus* oocytes: a combination of tracer flux measurements with electrophysiological measurements." Biochim Biophys Acta **945**(2): 167-174.

Seoh, S. A., D. Sigg, et al. (1996). "Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K⁺ channel." Neuron **16**(6): 1159-1167.

Shieh, C. C., M. Coghlan, et al. (2000). "Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities." Pharmacol Rev **52**(4): 557-594.

Shirokov, R., R. Levis, et al. (1992). "Two classes of gating current from L-type Ca channels in guinea pig ventricular myocytes." J Gen Physiol **99**(6): 863-895.

Sigworth, F. J. (1994). "Voltage gating of ion channels." Q Rev Biophys **27**(1): 1-40.

Slesinger, P. A., Y. N. Jan, et al. (1993). "The S4-S5 loop contributes to the ion-selective pore of potassium channels." Neuron **11**(4): 739-749.

Smith-Maxwell, C. J., J. L. Ledwell, et al. (1998a). "Role of the S4 in cooperativity of voltage-dependent potassium channel activation." J Gen Physiol **111**(3): 399-420.

Smith-Maxwell, C. J., J. L. Ledwell, et al. (1998b). "Uncharged S4 residues and cooperativity in voltage-dependent potassium channel activation." J Gen Physiol **111**(3): 421-439.

Starace, D. M. and F. Bezanilla (2001). "Histidine scanning mutagenesis of basic residues of the S4 segment of the shaker k⁺ channel." J Gen Physiol **117**(5): 469-490.

Starace, D. M. and F. Bezanilla (2004). "A proton pore in a potassium channel voltage sensor reveals a focused electric field." Nature **427**(6974): 548-553.

Starace, D. M., E. Stefani, et al. (1997). "Voltage-dependent proton transport by the voltage sensor of the Shaker K⁺ channel." Neuron **19**(6): 1319-1327.

Stefani, E., L. Toro, et al. (1994). "Gating of Shaker K⁺ channels: I. Ionic and gating currents." Biophys J **66**(4): 996-1010.

Strandberg, L., J. Karolin, et al. (1994). "Fluorescence studies on plasminogen activator inhibitor 1: reactive centre cysteine mutants remain active after fluorophore attachment." Thromb Res **76**(3): 253-267.

Stuhmer, W., J. P. Ruppersberg, et al. (1989). "Molecular basis of functional diversity of voltage-gated potassium channels in mammalian brain." EMBO J **8**(11): 3235-3244.

Sukhareva, M. (2003). "Constitutive Activation of the Shaker Kv Channel." The Journal of General Physiology **122**(5): 541-556.

Swartz, K. J. (2008). "Sensing voltage across lipid membranes." Nature **456**(7224): 891-897.

Tagliatela, M., G. E. Kirsch, et al. (1992). "Gating currents from a delayed rectifier K⁺ channel with altered pore structure and function." Biophys J **62**(1): 34-36.

Tagliatela, M., L. Toro, et al. (1992). "Novel voltage clamp to record small, fast currents from ion channels expressed in *Xenopus* oocytes." Biophys J **61**(1): 78-82.

Tempel, B. L., D. M. Papazian, et al. (1987). "Sequence of a probable potassium channel component encoded at Shaker locus of *Drosophila*." Science **237**(4816): 770-775.

Timpe, L. C., Y. N. Jan, et al. (1988). "Four cDNA clones from the Shaker locus of *Drosophila* induce kinetically distinct A-type potassium currents in *Xenopus* oocytes." Neuron **1**(8): 659-667.

Timpe, L. C., T. L. Schwarz, et al. (1988). "Expression of functional potassium channels from Shaker cDNA in *Xenopus* oocytes." Nature **331**(6152): 143-145.

Tiwari-Woodruff, S. K., M. A. Lin, et al. (2000). "Voltage-dependent structural interactions in the Shaker K(+) channel." J Gen Physiol **115**(2): 123-138.

Tombola, F., M. M. Pathak, et al. (2007). "The twisted ion-permeation pathway of a resting voltage-sensing domain." Nature **445**(7127): 546-549.

Tombola, F., M. M. Pathak, et al. (2005a). "How Far Will You Go to Sense Voltage?" Neuron **48**(5): 719-725.

Tombola, F., M. M. Pathak, et al. (2005b). "Voltage-Sensing Arginines in a Potassium Channel Permeate and Occlude Cation-Selective Pores." Neuron **45**(3): 379-388.

Tombola, F., M. M. Pathak, et al. (2006). "How does voltage open an ion channel?" Annu Rev Cell Dev Biol **22**: 23-52.

Tristani-Firouzi, M., J. Chen, et al. (2001). "Molecular biology of K(+) channels and their role in cardiac arrhythmias." Am J Med **110**(1): 50-59.

Tristani-Firouzi, M., J. Chen, et al. (2002). "Interactions between S4-S5 linker and S6 transmembrane domain modulate gating of HERG K⁺ channels." J Biol Chem **277**(21): 18994-19000.

Villalba-Galea, C. A., W. Sandtner, et al. (2008). "Inaugural Article: S4-based voltage sensors have three major conformations." Proceedings of the National Academy of Sciences **105**(46): 17600-17607.

Wang, M. H., S. P. Yusaf, et al. (1999). "Effect of cysteine substitutions on the topology of the S4 segment of the Shaker potassium channel: implications for molecular models of gating." J Physiol **521 Pt 2**: 315-326.

Webster, S. M., D. Del Camino, et al. (2004). "Intracellular gate opening in Shaker K⁺ channels defined by high-affinity metal bridges." Nature **428**(6985): 864-868.

Wua, Y. J. and S. I. Dworetzky (2005). "Recent developments on KCNQ potassium channel openers." Curr Med Chem **12**(4): 453-460.

Wyllie, D. J., P. Behe, et al. (1998). "Single-channel activations and concentration jumps: comparison of recombinant NR1a/NR2A and NR1a/NR2D NMDA receptors." J Physiol **510 (Pt 1)**: 1-18.

Wynia-Smith, S. L., A. L. Gillian-Daniel, et al. (2008). "hERG Gating Microdomains Defined by S6 Mutagenesis and Molecular Modeling." The Journal of General Physiology **132**(5): 507-520.

Xu, Y., Y. Ramu, et al. (2008). "Removal of phospho-head groups of membrane lipids immobilizes voltage sensors of K⁺ channels." Nature **451**(7180): 826-829.

Yang, N., A. L. George, Jr., et al. (1996). "Molecular basis of charge movement in voltage-gated sodium channels." Neuron **16**(1): 113-122.

Yifrach, O. and R. MacKinnon (2002). "Energetics of pore opening in a voltage-gated K(+) channel." Cell **111**(2): 231-239.

Yu, F. H. (2005). "Overview of Molecular Relationships in the Voltage-Gated Ion Channel Superfamily." Pharmacological Reviews **57**(4): 387-395.

Yusaf, S. P., D. Wray, et al. (1996). "Measurement of the movement of the S4 segment during the activation of a voltage-gated potassium channel." Pflugers Arch **433**(1-2): 91-97.

Zagotta, W. N. and R. W. Aldrich (1990). "Alterations in activation gating of single Shaker A-type potassium channels by the Sh5 mutation." J Neurosci **10**(6): 1799-1810.

Zagotta, W. N., S. Germeraad, et al. (1989). "Properties of ShB A-type potassium channels expressed in Shaker mutant *Drosophila* by germline transformation." Neuron **3**(6): 773-782.

Zagotta, W. N., T. Hoshi, et al. (1990). "Restoration of inactivation in mutants of Shaker potassium channels by a peptide derived from ShB." Science **250**(4980): 568-571.

Zagotta, W. N., T. Hoshi, et al. (1994). "Shaker potassium channel gating. II: Transitions in the activation pathway." J Gen Physiol **103**(2): 279-319.

Zheng, J. (2006). "Patch fluorometry: shedding new light on ion channels." Physiology (Bethesda) **21**: 6-12.

Zhou, Y., J. H. Morais-Cabral, et al. (2001). "Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution." Nature **414**(6859): 43-48.

7. Annexe

7.1. Annexe 1 : Le « Voltage Clamp »

Le « voltage clamp » est une approche idéale qui permet de contrôler le potentiel à travers la membrane cellulaire. Elle consiste à mesurer le courant (I_m) dans un système biologique pendant que la différence de potentiel est maintenue de part et d'autre de la membrane (V_m). Le potentiel membranaire est conservé par l'entremise d'un circuit à rétroaction (« feedback ») qui contrôle l'injection de courant afin de garder le voltage constant. Son utilité primaire par rapport au « current clamp » provient du fait qu'il permet la séparation des courants ioniques membranaires et capacitifs. De plus, il offre la possibilité de mesurer les courants ioniques à partir d'une zone de la membrane où le voltage est « uniforme » et « contrôlé ». Le principe peut être visualisé en considérant le circuit équivalent de la figure 7.1.

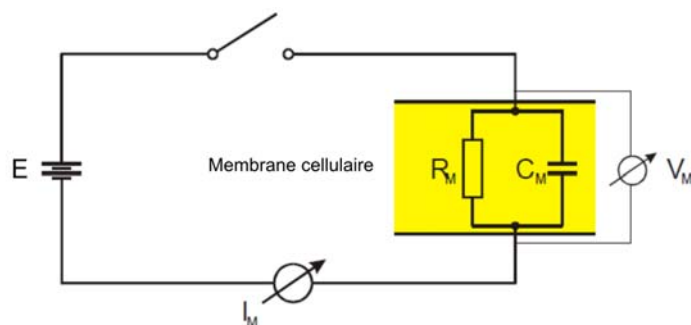


Figure 7.1. Le voltage imposé (« clamp »).

La batterie impose un voltage (V_c) au système membranaire. La résistance membranaire est R_m et la capacité C_m . Un ampèremètre permet de mesurer le courant et un interrupteur permet de charger et de décharger le système. Dans un cas idéal, dès que l'interrupteur se ferme (circuit fermé), $V_c = V_m$. Adapté de (Hille, 2003).

Maintenant, ce qui est essentiel lorsqu'on travaille en électrophysiologie par voltage imposé est la qualité du « clamp ». Les critères électriques à considérer sont les suivants : l'exactitude lors du réglage du voltage, la vitesse du clamp et son isopotentialité.

7.2. Annexe 2 : « Twin Electrode Voltage Clamp » TEV

Afin d'imposer un voltage à de grande cellule telle que les ovocytes, on utilise une seconde électrode qui nous permet de déterminer à différent endroit indépendamment le potentiel membranaire. Le schéma présenté à la Figure 7.2 illustre le voltage imposé par double électrode dans un système d'ovocyte et la légende décrit le montage.

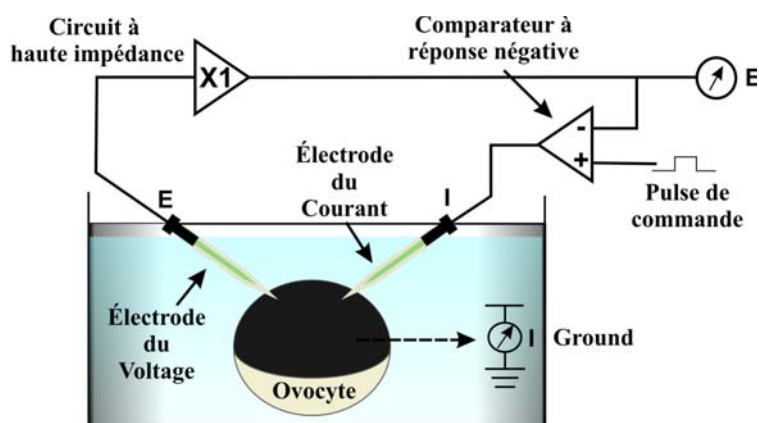


Figure 7.2. Méthode de la double électrode.

Le montage consiste d'une électrode intracellulaire avec un circuit d'amplification pour mesurer le potentiel membranaire, un amplificateur à réponse négative (« Negative Feedback ») pour diminuer la différence entre le potentiel de commande et celui mesuré, avec une deuxième électrode pour injecter le courant par la sortie de l'amplificateur à réponse négative. Pour éliminer l'étalement des courants locaux, cette méthode mesure le potentiel membranaire dans une région où il n'y a aucune variation spatiale du potentiel membranaire.

Cette installation en voltage imposé a de grandes ressemblances à l'instrument expérimental utilisé dans le cadre de ce projet : le « Cut-Open Voltage clamp » (COVC) (Méthodologie 1.2). L'éclaircissement des faiblesses de TEV exposera les critères nécessaires à améliorer pour mesurer les courants de « gating ».

En général, le système est excellent pour mesurer les courants ioniques des canaux voltage dépendants. Toutefois, certaines limites complexifient l'erreur sur la réponse du circuit et, par le fait même, le signal mesuré. À cause de la grandeur de l'ovocyte, il se peut que les électrodes produisent des chutes de potentiel locales dans leur solution environnante. Cela a pour effet de garder seulement l'électrode à des potentiels constants

et ce problème est grandement relié à la résistance de série R_s . Toutefois, il faut comprendre que ce biais sera toujours présent lorsqu'on travaille avec des grandes cellules. Les conséquences de cette résistance affectent directement la vitesse du « clamping » et surtout l'uniformité spatiale du voltage membranaire.

Afin de minimiser l'erreur due à la résistance en série et d'éliminer le problème du « space clamping », on requiert un « clamp » stratégique. Le but est de limiter la grosseur du système pour éliminer les variations créées par la forme du milieu. Ce problème peut être réglé en utilisant une surface membranaire délimitée par l'anatomie naturelle de système en soi ou par un facteur mécanique, telle une barrière, ou électrique (Guard Shield). Cet aspect systématique sera présenté dans la méthodologie à la section du COVC.