



**UNIVERSITE DE LIEGE**

**Faculté de médecine**

**GIGA Neurosciences**

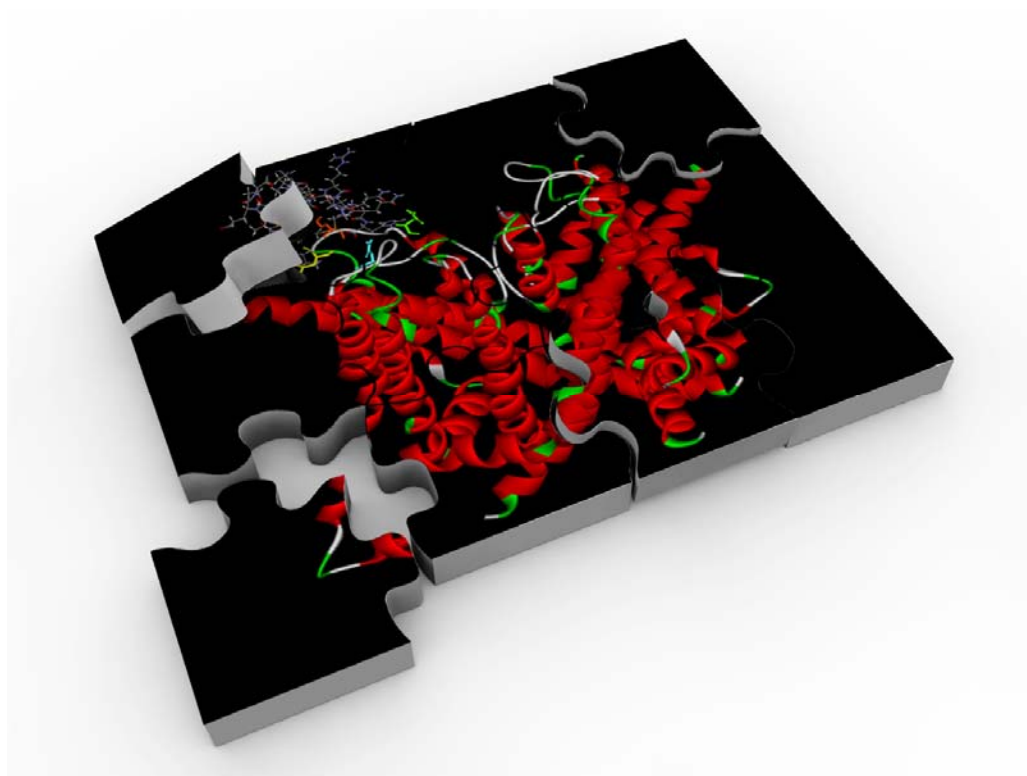


**Unité d'électrophysiologie**

**Professeurs V. Seutin et J.-F. Liégeois**

---

# Propriétés biophysiques et pharmacologie des canaux $K_{Ca2}$



**Cédric Lamy**

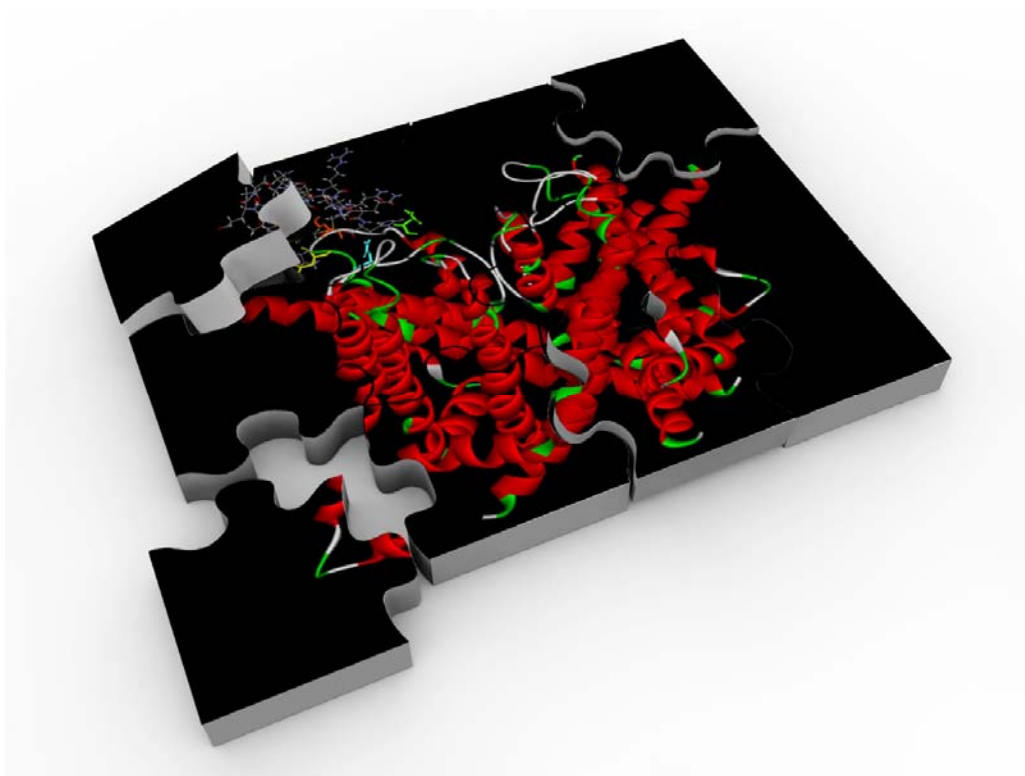
Pharmacien

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences  
Biomédicales et Pharmaceutiques**

---

Année académique 2010-2011

# Propriétés biophysiques et pharmacologie des canaux $K_{Ca2}$



**Cédric Lamy**

Pharmacien

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences  
Biomédicales et Pharmaceutiques**

---

Année académique 2010-2011

## Résumé

Les canaux potassiques de faible conductance (SK ou  $K_{Ca2}$ ) sont impliqués dans l'excitabilité des neurones, notamment par la génération de la post-hyperpolarisation de durée moyenne. Nous avons mis en œuvre diverses techniques afin d'explorer les propriétés biophysiques et la pharmacologie de ces canaux.

Nous avons mis en évidence l'inhibition de ces canaux par les protons extracellulaires et identifié les sites d'interactions composés de résidus histidine. De plus, une différence de sensibilité entre deux sous-types de canaux a été mise en évidence. La raison de cette différence est la présence d'un résidu histidine supplémentaire sur la séquence d'un des sous-types.

Dans une seconde partie, nous avons identifié sur ces canaux de nouveaux sites d'interactions de l'apamine qui est le bloqueur de référence. Nous avons également conclu que l'apamine n'était pas un bloqueur de pore et nous avons proposé un mécanisme de blocage de type allostérique.

Dans la dernière partie nous avons mis en évidence que la 1,3-di-*o*-tolyl-guanidine (DTG), classiquement décrite comme agoniste  $\sigma$ , pouvait également bloquer les canaux  $K_{Ca2}$ . Nous avons commencé l'exploration du mécanisme d'action de cette molécule sans, jusqu'à présent, avoir découvert le site d'interaction avec le canal.

## Abstract

Small conductance calcium activated potassium channels (SK or  $K_{Ca2}$ ) are implicated in the neuronal excitability by underlying after-hyperpolarisation of medium duration. We have used several techniques to explore the biophysics and the pharmacology of those channels.

We have revealed the inhibition of the channels by extracellular protons, and we have identified interaction sites composed of histidine residues. A differential sensitivity to protons among two different sub-types was highlighted; it was due to the presence of an extra histidine on one sub-type sequence.

In a second part, we have identified new interactions sites of apamin, which is the blocking agent of reference for  $K_{Ca2}$  channels. We have also concluded that apamin is not a pore blocker, and proposed an allosteric block mechanism.

In the last part, we have established that the 1,3-di-*o*-tolyl-guanidine (DTG), classically described as a  $\sigma$  agonist, was able to block the  $K_{Ca2}$  channels. We have started to explore this molecule's block mechanism, but the interaction site has not yet been identified.

## **Droits d'auteurs**

Ce travail est le fruit d'une étroite collaboration avec le laboratoire du Pr. Neil V. Marrion de l'Université de Bristol et le Pr. Jean-François Liégeois du laboratoire de chimie pharmaceutique de l'Université de Liège. Le travail effectué par des tiers ou en collaboration avec des tiers n'appartenant pas à l'Université de Liège est signalé dans le texte.

La licence pour l'usage du logo de la couverture et de la page de rappel pour le présent travail à été accordé à Cédric Lamy par Olivier Frascone et reste cependant la propriété de Butterfly Pixel®.

Ce document est rendu disponible par les auteurs qui y ont contribué en vue d'assurer la diffusion à temps de travaux savants et techniques sur une base non-commerciale. Les droits de copie et autres droits sont gardés par les auteurs et par les détenteurs du copyright. Les personnes copiant ces informations doivent adhérer aux termes et contraintes couverts par le copyright de chaque auteur. Ces travaux ne peuvent pas être rendus disponibles ailleurs sans la permission explicite du détenteur du copyright.

This material is presented to ensure timely dissemination of scholarly and technical work. Copyright and all rights therein are retained by authors or by other copyright holders. All person copying this information are expected to adhere to the terms and constraints invoked by each author's copyright. In most cases, these works may not be reposted without the explicit permission of the copyright holder.



## Remerciements

Je souhaite chaleureusement remercier mes parents pour m'avoir offert toutes les facilités pour entamer et poursuivre mes études. Rien de ceci n'aurait pu arriver sans leur indéfectible soutien. Il est difficile d'exprimer à quel point je leur suis reconnaissant. Cette thèse leur est entièrement dédiée.

Merci Sophie pour m'avoir particulièrement bien soutenu et encouragé pendant la dure période de rédaction. Je n'oublierai pas le « un seul épisode, c'est la loi... » ;-)

Je tiens à remercier chaleureusement mes trois superviseurs, tous empreints de grandes qualités scientifiques et humaines. Ils m'ont apporté soutien et connaissances dans leurs domaines respectifs :

Jean-François Liégeois, je suis heureux d'avoir pu continuer de travailler avec vous après mon DEA : «  *finalement, on s'est bien marré !* » Je terminerai par une *private joke*: merci pour le binding....

Neil Marrion, thank you for giving me the opportunity to work with you, it was a real pleasure both on the personal and professional front.

Vincent Seutin, merci de m'avoir donné l'opportunité de réaliser un doctorat dans votre laboratoire et surtout de m'avoir laissé sortir des sentiers battus. J'espère que le résultat est à la hauteur de la confiance accordée.

Big thanks to my friend Sam, we went through this adventure together and we can be proud of the final work. Sometimes it can be dangerous to mix work and friendship but we have transformed this threat into a real strength that pushed us further than I could never have imagined, thanks a lot mate!

Merci à Christelle pour sa bonne humeur et son aide technique frisant la perfection.

Merci à Seb pour le temps qu'il a consacré à l'iconographie 3D.

Tous les membres du labo doivent être remerciés, on apprend tout les jours de tout le monde, un merci particulier à Amaury et Oli... et merci pour la bonne ambiance du labo d'électrophysie pendant les longues séances de manipulation (Laurent, Phil, Dominique, Kumar et Jacqueline). Merci aussi à Nath, Danielle, Nicole et Guillaume pour leur bonne humeur.

Un merci et un clin d'œil à mon ami Olivier qui m'a souvent aidé dans les tracasseries informatiques et qui m'a fait l'honneur de créer la couverture du manuscrit.

Merci à la région Wallonne, UCB et à la Fondation Léon Frédéricq pour leur soutien financier.

Merci aux membres du GIGA neurosciences pour l'excellente ambiance de travail.

Merci à Gunther.

## Table des matières

Résumé .....	3
Abstract .....	3
Droits d'auteurs .....	4
Remerciements .....	5
Table des matières .....	6
Liste des abréviations .....	8
Tableau des acides aminés .....	9
<b>1 Introduction Générale</b> .....	10
<b>2 Introduction : les canaux potassiques</b> .....	12
2.1 La question de la perméabilité sélective des canaux $K^+$ .....	14
2.2 Les canaux potassiques activés par le calcium .....	18
2.2.1 <i>Les canaux BK</i> .....	19
2.2.2 <i>Les canaux IK</i> .....	20
2.2.3 <i>Les canaux SK</i> .....	21
2.2.3.1 <i>Distribution des canaux SK</i> .....	21
2.2.3.2 <i>Fonction des canaux SK</i> .....	21
2.2.3.3 <i>La structure des canaux SK : comparaison avec d'autres canaux <math>K^+</math></i> .....	23
2.2.3.4 <i>Organisation et régulation de la localisation membranaire des SK</i> .....	25
2.2.3.5 <i>Pharmacologie des canaux SK</i> .....	27
2.2.3.6 <i>Mécanisme d'activation par le <math>Ca^{2+}</math></i> .....	31
2.2.3.7 <i>Le phénomène de rectification entrante</i> .....	32
2.2.3.8 <i>Sélectivité des canaux SK</i> .....	34
<b>3 Objectifs du travail</b> .....	36
<b>4 Méthodologie générale</b> .....	37
4.1 Electrophysiologie .....	37
4.2 Culture cellulaire .....	38
4.3 Plasmides .....	39
4.4 Mutagenèse dirigée .....	40
4.5 « Curve fitting » .....	41
4.6 Statistiques .....	42
4.7 Binding et préparation membranaire .....	42
4.8 Les cellules de type HEK293 .....	43
<b>5 Résultats : Inhibition des canaux SK par les protons</b> .....	45
5.1 Introduction .....	45
5.2 Justification du tampon calcique .....	46
5.3 Solutions utilisées .....	47
5.4 Expérience contrôle permettant d'exclure une courbe d'activation par le $Ca^{2+}$ différente à bas pH .....	47
5.5 Inhibition différentielle des canaux SK2 et SK3 par l'augmentation extracellulaire de $[H^+]$ .....	48
5.6 Mécanisme moléculaire du bloc par les protons .....	49
5.7 Un résidu histidine dans la partie S5-boucle P est crucial pour l'inhibition du courant par les protons .....	51
5.8 Une histidine supplémentaire sur SK3 est responsable de la plus grande sensibilité du canal à une diminution de pH .....	54
5.9 L'histidine commune reste le contributeur principal de l'inhibition par un bas pH .....	56
5.10 Discussion .....	58
<b>6 Résultats : Mécanisme du blocage par l'apamine</b> .....	60
6.1 Introduction .....	60

6.2	Méthodes : solutions utilisées .....	61
6.3	Inhibition différentielle des sous-types de canaux SK par l'apamine .....	62
6.4	L'apamine se fixe avec une haute affinité aux canaux homomériques SK2 et SK3 .....	63
6.5	Un résidu histidine au niveau de la tourelle externe du pore est crucial pour le blocage du courant par l'apamine .....	64
6.6	Le résidu histidine contribue également au blocage par d'autres molécules .....	67
6.7	Le mutant SK2H337N reste sensible à l'application de TEA extracellulaire .....	69
6.8	L'apamine et le TEA n'interagissent pas avec la même région du canal : démonstration par des expériences de cinétique de blocage .....	71
6.9	Expériences de modélisation et de « docking » .....	76
6.10	Validation du modèle par le TEA .....	81
6.11	Validation de nos modèles de canaux par mutagenèse d'un site d'interaction découvert <i>in silico</i> .....	82
6.12	La position SK2N368 est importante pour la haute sensibilité de SK2 vis-à-vis de l'apamine .....	84
6.13	Discussion .....	87
<b>7</b>	<b>Résultats : Effet du 1,3-di-<i>o</i>-tolyl-guanidine (DTG) sur les courants SK</b> .....	<b>90</b>
7.1	Introduction .....	90
7.2	Méthode : solutions utilisées .....	92
7.3	Le DTG bloque directement les canaux SK .....	93
7.4	Etude préliminaire qualitative du site d'interaction potentiel du DTG sur les canaux SK .....	95
7.5	Le DTG bloque le mutant insensible à l'apamine .....	96
7.6	Discussion .....	99
<b>8</b>	<b>Discussion générale</b> .....	<b>101</b>
<b>9</b>	<b>Références</b> .....	<b>103</b>
<b>10</b>	<b>Annexes : Publications relatives au mémoire</b> .....	<b>114</b>

## Liste des abréviations

- BAPTA : (Ethylenedioxybis(o-phenylenitrilo)tetraacetic acid, 2,2'-(Ethylenedioxy)dianiline-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid)
- CaM : Calmoduline
- CaMBD : Calmodulin Binding Domain
- CK2 : Protéine kinase CK2
- DTG : 1,3-di-*o*-tolyl-guanidine
- DTM : Domaine transmembranaire
- EGFP : Enhanced Green Fluorescent Protein
- EGTA : (Ethyleneglycol-O, O'-bis(2-aminoethyl)-*N, N, N', N'*-tetraacetic acid)
- FEP : Free Energy Perturbation
- FS : Filtre de sélectivité
- HEK-293: Human Embryonic Kidney-293
- KcsA : *Streptomyces lividans* potassium channel
- Kir : Inward-rectifier potassium channel
- Kv : Voltage-dependent potassium channel
- LB: Lysogeny Broth
- mPHP : Post-hyperpolarisation de durée moyenne
- NMDG : N-méthyl-D-glucamine
- PDB : Protein Data Bank
- PHP : Post-hyperpolarisation
- $P_{K(Ca)}$  : Courant potassique activé par le calcium
- PKA : Protéine kinase A
- PP2A : Protéine phosphatase 2A
- RE : Réticulum endoplasmique
- RMN : Résonance magnétique nucléaire
- RMS : Root Mean Square
- $R\sigma$  : Récepteurs Sigma
- $R\sigma-1$  : Récepteurs Sigma-1
- *Shaker* : Voltage-dependent potassium channel
- TBB : 4,5,6,7-Tetrabromo-2-azabenzimidazole
- TEA : Tetraethylammonium

## Tableau des acides aminés

Acides aminés	Abréviation 3 lettres	Abréviation 1 lettre
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Acide aspartique	Asp	D
Cystéine	Cys	C
Acide glutamique	Glu	E
Glutamine	Gln	Q
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Méthionine	Met	M
Phénylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Sérine	Ser	S
Thréonine	Thr	T
Tryptophane	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V
Un acide aminé		X

# 1 Introduction Générale

Dans beaucoup de domaines, le fonctionnement d'un système nécessite l'échange d'informations. L'efficacité de cet échange est principalement tributaire de deux propriétés : la quantité d'information transportable et la vitesse de transmission. Cette réflexion peut, par exemple, s'appliquer aux processeurs utilisés par les ordinateurs dont la vitesse de calcul, d'échange et de traitement d'informations est en perpétuelle accélération. En informatique, ce besoin de vitesse en perpétuelle augmentation se traduit par des systèmes de plus en plus complexes permettant la gestion de l'affichage réel en trois dimensions ou encore le multitâche. Ceci illustre parfaitement le concept que plus un système est compliqué, plus la vitesse et la capacité d'échange d'information sont cruciaux pour un fonctionnement optimal. L'être humain, pour exister sous la forme que nous connaissons tous, est un magnifique exemple d'un système pouvant intégrer un nombre gigantesque de données, les traiter parfois même les anticiper. La nature a dû développer un moyen qui nous permet d'être efficace dans le traitement de l'information et nous a donc doté d'un organe extrêmement sophistiqué : le cerveau. Il s'agit certainement de l'organe le plus complexe du corps humain. Indirectement la diversité des disciplines en neurosciences illustre bien ce propos. Comme je l'ai évoqué, plus un système devient complexe, plus il a besoin d'une vitesse d'échange de l'information élevée. Une des solutions développée par la nature pour atteindre ce niveau de performance est l'utilisation d'un phénomène électrique à savoir, le potentiel d'action. Au niveau du cerveau, l'unité principale de traitement de l'information est le neurone. Ce dernier voit sa membrane maintenue aux alentours de  $-65$  mV par l'action de pompes ioniques et de canaux de fuites. Lorsqu'il est activé par un stimulus dépolarisant, un mécanisme concerté entre différents canaux ioniques va permettre l'émission d'un potentiel d'action pendant lequel le potentiel membranaire va brièvement s'inverser pour devenir positif aux alentours de  $30$  mV. La membrane est ensuite repolarisée et, dans certains neurones, hyperpolarisée vers  $-80$  mV afin de créer une période réfractaire. Durant celle-ci, un stimulus dépolarisant ne sera pas suffisamment puissant pour générer un autre potentiel d'action. Les canaux étudiés dans ce travail, les canaux SK2 et 3 ou KCa2.2 et 3, sont précisément impliqués dans la phase d'hyperpolarisation, qui a une importance notable dans l'excitabilité neuronale. Dans ce travail, nous n'allons quasiment pas envisager de phénomène physiologique comme le potentiel d'action. Nos recherches s'inscrivent à un niveau plus fondamental en se focalisant sur la structure des canaux et leurs sites d'interactions extracellulaires avec diverses

molécules ainsi qu'une entité minuscule à savoir, le proton. L'étude de la structure et du comportement à l'échelle moléculaire de ces canaux s'inscrit dans un objectif plus général qui est le design de bloqueurs extracellulaires sélectifs de ces canaux. En effet, connaître un site d'interaction, identifier où se forment les liaisons entre une molécule et sa cible, pourrait donner des indices pour le développement de nouvelles molécules destinées à favoriser ou défavoriser certaines liaisons afin d'interagir sélectivement avec un des trois sous-types de canaux SK.

Si nous prenons un peu de distance par rapport à ce travail, nous verrons que l'obtention de molécules sélectives pourrait s'inscrire dans de futures recherches concernant le traitement de certaines pathologies neurologiques. Par exemple, un bloqueur sélectif pour le sous-type SK2 pourrait-être promnésiant au vu de la densité de ce sous-type au niveau de l'hippocampe tandis qu'un bloqueur sélectif des canaux SK3 pourrait augmenter l'activité des neurones sérotoninergiques dans le raphé dorsal et donc augmenter la sécrétion de sérotonine dans le cadre d'un traitement rapide de la dépression. Un blocage de ce même sous-type dans le cadre de la maladie de parkinson pourrait augmenter l'excitabilité des neurones survivants de la substance noire.

## 2 Introduction : les canaux potassiques

La structure typique d'un canal potassique consiste en un assemblage de quatre sous-unités formant un pore. Les canaux potassiques sont nombreux et existent sous diverses formes qui permettent d'établir un sous-classement en fonction de leur structure. Des zones de structure conservées, comme le filtre de sélectivité, demeurent cependant afin que la protéine puisse jouer son rôle de base qui consiste à conduire des ions  $K^+$  à travers la membrane cellulaire.

Il existe quatre grandes classes de canaux potassiques. La structure la plus simple consiste en 2 domaines transmembranaires (DTM) : M1 et M2, une boucle P (une hélice alpha située entre deux DTM) et le filtre de sélectivité comme illustré par la figure 1. Les principaux canaux ayant cette architecture sont les Kir et le KcsA. Elle représente en quelque sorte la structure canonique des canaux potassiques (Choe, 2002).

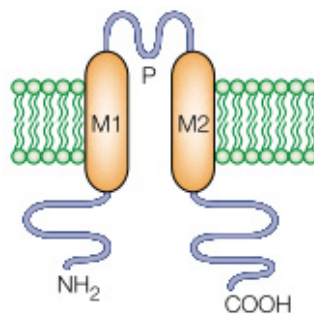
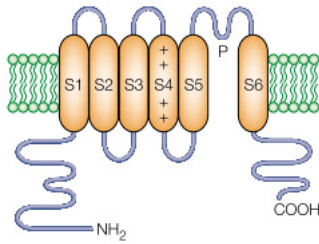


Figure 1 : Sous-unité à 2 DTM (d'après Choe et al., 2002)

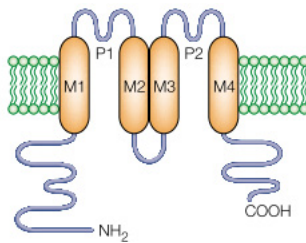
L'ajout de quatre DTM supplémentaires (S1-S4) confère à certains canaux la capacité de changer de conformation en fonction du potentiel membranaire, il s'agit des canaux voltage dépendant ( $K_v$ ) à 6 DTM dont le prototype est illustré par la figure 2. Cette famille comporte également d'autres sous-familles comme les SK (SK/IK), mslo (canaux BK), eag (canaux voltage dépendant ether a-go-go), CNG1 (cyclic nucleotide gated), NCN1 (activé par l'hyperpolarisation) et les KCNQ1 (canaux voltage-dépendant). Les canaux BK ( $K_{VCa}$  ou slo) possèdent un domaine transmembranaire supplémentaire qui oriente leur extrémité N-terminale vers le milieu extracellulaire. (S0-S6).





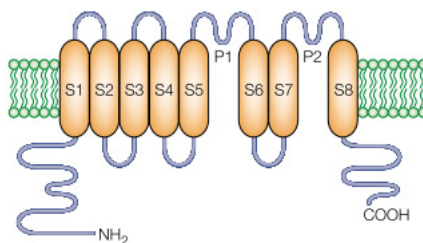
**Figure 2 : Prototype d'une sous-unités de K<sub>v</sub> (d'après Choe et al., 2002).**

Il existe également des sous-unités à 4 DTM (M1-M4) constituées de deux séquences répétées de 2 DTM, ces sous-unités possèdent donc deux boucles P (figure 3) et s'assemblent en dimères et non pas en tétramères pour former les canaux TWIK, THIK, TREK, TASK, TALK et TRESK (Bayliss and Barrett, 2008; Lotshaw, 2007).



**Figure 3 : Prototype d'une sous-unité à 4 DTM (d'après Choe et al., 2002).**

La dernière classe de structure correspond à la succession d'une sous-unité à 6 DTM et d'une à 2 DTM (S1-8) formant ainsi une structure asymétrique (figure 4). Ces canaux n'ont été décrits jusqu'à présent que chez les *fungi*, notamment dans les *Saccharomyces*, ces canaux peu connus sont appelés Tok1p .



**Figure 4 : Prototype d'une sous-unité à 8 DTM (d'après Choe et al.,2002)**

## 2.1 La question de la perméabilité sélective des canaux K<sup>+</sup>

Le passage des ions à travers les canaux potassiques s'effectue uniquement grâce au potentiel électrochimique. Une des premières tentatives d'explication d'un mécanisme de conduction fut donnée en 1959 (Mullins, 1959) :

*“The most acceptable model of the membrane is one composed of aqueous pore with intervening ion-impermeable areas”*

*“If an ion is to penetrate through a membrane composed of small pores, it must replace the water molecules that are serving as hydration with other molecules (the pore walls) which will serve this function”*

La compréhension du mécanisme de « perméation » et de sélectivité est non seulement un progrès pour la recherche fondamentale, mais elle trouve aussi son application dans des domaines appliqués. En effet, le développement important des nanotechnologies entraîne une demande croissante de techniques permettant de distinguer ou de filtrer des ions (Gong et al., 2010)

Le rôle fondamental d'un canal potassique est de conduire rapidement et sélectivement les ions K<sup>+</sup>. Il est fascinant qu'une structure protéique soit capable de mener à bien cette tâche car les caractéristiques physico-chimiques des ions Na<sup>+</sup> et K<sup>+</sup> sont assez proches. En effet, ils sont chargés de la même manière, leurs rayons atomiques sont du même ordre de grandeur et leurs caractéristiques d'hydratation sont similaires. Cette dernière propriété semble d'ailleurs être importante. En effet, bien que les ions K<sup>+</sup> soient un peu plus volumineux que les ions Na<sup>+</sup> il s'avère que le filtre de sélectivité des canaux Na<sup>+</sup> est plus large que celui des canaux K<sup>+</sup> (Hille, 2001; Shao et al., 2009)

La sélectivité des canaux potassiques repose sur une séquence en acides aminés très conservée aussi bien dans les bactéries archées (anciennement archéobactéries) que chez les eucaryotes (MacKinnon, 2003). Cette séquence est essentiellement composée d'une succession de trois acides aminés « glycine-tyrosine-glycine » (GYG) le plus souvent précédée d'une valine ou d'une leucine et suivie par un aspartate. Le mécanisme de sélectivité repose sur une imitation de l'environnement de solvation des ions potassiques par les groupements carbonyles du filtre de sélectivité. L'ion va perdre son manteau aqueux de solvation le temps de la traversée à travers le filtre pour être ensuite resolvaté dans la cavité

interne du pore ou dans le milieu extracellulaire. En plus de permettre la désolvatation, les sites d'interaction ne doivent pas générer une compensation énergétique trop importante afin de favoriser la circulation des ions à travers le filtre. La majorité des canaux potassiques ont une sélectivité supérieure d'un facteur 1000 pour les ions potassium par rapport aux ions sodium, bien que les rayons atomiques de ces deux ions ne diffèrent que de  $\sim 0.38 \text{ \AA}$  (Noskov and Roux, 2006), ces rayons étant de  $0.95 \text{ \AA}$  et  $1.33 \text{ \AA}$  pour le  $\text{Na}^+$  et le  $\text{K}^+$  respectivement.

Le passage d'un ion à travers un canal ionique est un phénomène qui n'atteint pas l'équilibre et qui résulte d'une combinaison subtile entre les différentes énergies libres d'un ion entre la solution et le canal. En effet, la liaison entre les molécules d'eau et les petits ions étant relativement forte ( $-98 \text{ kcal/mol}$  pour  $\text{Na}^+$  et  $-80 \text{ kcal/mol}$  pour  $\text{K}^+$  (Noskov and Roux, 2007)) d'après (Friedman et al., 1973), le canal doit donc créer des sites d'interactions ayant au moins cet avantage énergétique. Le phénomène de sélectivité serait donc une compensation énergétique favorable pour un type d'ion plutôt que pour un autre.

La compréhension du phénomène de sélectivité semble s'inscrire au-delà de la perception statique d'un canal et d'un ion ayant un rayon défini. Il est évident que l'image statique d'un canal KcsA obtenu par cristallographie semble inclure parfaitement un ion  $\text{K}^+$  (mécanisme appelé « snug-fit » (Bezaniilla and Armstrong, 1972) ).

La théorie du « snug-fit » implique donc que le filtre de sélectivité possède une rigidité au niveau du sub-angström vu la petite différence de taille entre les ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  et le fait que le mécanisme de désolvatation par les chaînes carbonyles est le même pour les deux espèces. Sachant qu'une protéine possède une certaine flexibilité, il est probable que cette image statique ne soit pas totalement exacte (Noskov et al., 2004; Noskov and Roux, 2007). En effet, des expériences de modélisation dynamique d'énergies libres de perturbation (Free Energy Perturbation ou FEP) sur KcsA, dont les résultats de sélectivité obtenus sont en accord avec les résultats expérimentaux, montrent une fluctuation atomique de l'ordre de  $\sim 1.0 \text{ \AA}$  RMS pour la molécule entière et de  $\sim 0.8 \text{ \AA}$  RMS pour les groupes carbonyles longeant le filtre de sélectivité, ce qui est bien plus large que la différence de taille entre  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  ( $\sim 0.38 \text{ \AA}$ ). Cette constatation représente une première évolution de la théorie du « snug-fit ». Bien qu'une bonne partie de ce concept semble relativement correcte, à savoir une certaine corrélation entre la taille du pore et celle de l'ion, le fait de travailler à une échelle si petite nous confronte avec le problème de la légère fluctuation de la structure de la protéine et

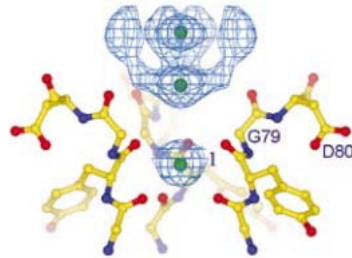
pousse à l'élaboration d'hypothèses plus complexes qu'un simple problème de volume ionique.

La fluctuation de structure d'une protéine due à la transition entre plusieurs états énergétiquement proches est un concept bien accepté. Une telle fluctuation a pu être mise en évidence dans le cadre des canaux ioniques. La flexibilité de la région du pore externe a effectivement été démontrée par la création d'un canal KcsA muté (G77D-ALA) qui est bloqué en position ouverte. Le canal sauvage KcsA ne conduit pas le Na<sup>+</sup> en absence de K<sup>+</sup> car le canal subit un collapsus (pas de conduction entrante ni sortante). Par contre, l'introduction de la mutation maintenant le canal ouvert permet de conduire le Na<sup>+</sup> dans les deux sens et ce, en l'absence de K<sup>+</sup>. Ceci vient donc supporter l'hypothèse que cette partie du pore n'est pas totalement rigide et peut s'adapter aux ions Na<sup>+</sup>. L'absence de courant dans le canal sauvage n'est donc pas due au fait que les ions Na<sup>+</sup> sont incapables de passer le filtre de sélectivité, mais bien au fait qu'ils favorisent une conformation fermée en l'absence de K<sup>+</sup>, du moins pour ce canal (Valiyaveetil et al., 2006).

Il semble donc que la sélectivité ne s'arrête pas uniquement à la structure du filtre de sélectivité mais également à la structure entière du canal. Le processus de sélectivité doit également être abordé parallèlement avec le cheminement des ions à travers le canal. Le fait que les canaux potassiques dans des conditions physiologiques peuvent, en général, conduire à travers la membrane d'une manière passive et sélective  $\sim 10^8$  ions par seconde implique également une architecture fortement aboutie. La description, que l'on peut considérer comme classique, du mouvement des ions à travers le pore est celle d'un mécanisme concerté de progression d'une seule file d'ions. Chaque ion occupe une place déterminée dans le pore et se déplace de proche en proche, mû par la répulsion électrostatique d'un autre ion et ce suivant le sens du gradient électrochimique. Les déplacements ioniques s'effectuent facilement car la barrière énergétique à franchir est de maximum 2–3 kcal/mol. Ce mécanisme implique donc que lorsqu'un ion doit pénétrer d'un côté du canal, un autre doit en sortir simultanément par le côté opposé.

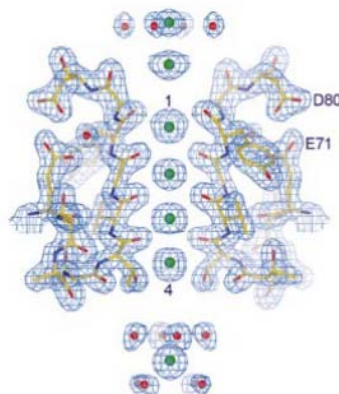
La diffraction par rayon X à la résolution de 2 Å, réalisée à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre la structure tetramérique du KcsA (Zhou et al., 2001), a permis de bien visualiser la conformation du filtre de sélectivité et des sites de fixation disponibles pour les ions K<sup>+</sup>.

Du côté extracellulaire, le filtre de sélectivité expose quatre atomes d'oxygène de la Gly 79 directement vers le milieu formant un anneau délimitant l'entrée du pore et facilitant l'hydratation et déshydratation des ions  $K^+$  (figure 5).



**Figure 5 : Modèle représentant les atomes d'oxygène (en rouge) pointant vers la solution extracellulaire (d'après Zhou et al., 2001).**

Juste en dessous, les paires carboxyl-carboxylates formées par les chaînes latérales des Glu71 et Asp 80 forment quatre charges négatives, la partie extracellulaire du canal est donc riche en charges négatives idéales pour attirer les cations (figure 6).



**Figure 6 : Modèles représentant les Glu 71 et Asp 80 formant une couronne de charges négatives autour du filtre de sélectivité (d'après Zhou et al., 2001).**

Ce qui précède ne représente qu'une fraction de toutes les théories et hypothèses sur les phénomènes de sélectivité et de conductance. Il est bien entendu logique que l'exploration de tels phénomènes soit extrêmement ardue et vaste. Les résolutions des expériences permettant de modéliser l'un ou l'autre canal sont extraordinaires, mais encore trop faibles pour apprécier des phénomènes qui se déroulent à une échelle peut-être inférieure à 1 Å.

## 2.2 Les canaux potassiques activés par le calcium

Les canaux potassiques activés par le calcium sont subdivisés en trois groupes. Bien que d'autres caractéristiques les séparent, le classement principal se base sur leur conductance unitaire décrite comme grande, intermédiaire et faible. La nomenclature de ces canaux est assez hétéroclite et varie en fonction de la discipline cherchant à les décrire. Le tableau ci-dessous reprend les noms rencontrés dans la littérature et est principalement d'après un ouvrage de référence écrit par Bertil Hille (Hille, 2001) (Tableau 1) .

<b>Conductance</b>	<b>Ancienne nomenclature</b>	<b>Nouvelle nomenclature</b>	<b>Préfixe du gène</b>	<b>Autre</b>
Elevée (100-250 pS)	BK, MaxiK	K <sub>Ca</sub> 1.1	KCNMA	slo
Intermédiaire (20-85 pS)	IK, SK4	K <sub>Ca</sub> 3.1	KCNN4	
Faible (10-20 pS)	SK 1-3	K <sub>Ca</sub> 2.1- 2.3	KCNN1-3	

**Tableau 1 : Noms de canaux potassiques activés par le calcium.**

La première preuve électrophysiologique d'un courant K<sup>+</sup> dépendant du calcium a été apportée dans les années septante par injection de calcium intracellulaire dans des neurones d'aplysie et la mise en évidence d'un tel courant dans les motoneurones de la moelle chez le chat. Ce courant a, ensuite, été identifié dans d'autres types de cellules excitables ou sécrétrices. La plupart de ces conductances étaient sensibles au voltage et montraient une sensibilité au TEA (tetraethylammonium) de l'ordre du milli-molaire, ce qui correspondait bien aux caractéristiques des courants enregistrés en « single-channel » début des années 80 et à celles des canaux désormais appelés BK. Ces canaux ont été identifiés comme responsables de la post-hyperpolarisation ou PHP (AHP en anglais). Cette dernière peut durer parfois plusieurs centaines de ms et amener la membrane à des potentiels fortement hyperpolarisés. De tels potentiels ne sont pas compatibles avec la courbe d'activation des canaux BK (bien illustrée dans (Cui et al., 2009)) car la concentration en Ca<sup>2+</sup> devrait rester beaucoup trop élevée (dans l'ordre du µM) durant toute la durée de l'AHP (Vogalis et al., 2003). D'autres études ont, dès lors, permis d'identifier une seconde conductance dépendante du Ca<sup>2+</sup>,

insensible au voltage, montrant une très faible sensibilité au TEA et bloquée par l'apamine. Les canaux SK étaient découverts (Blatz and Magleby, 1986).

### 2.2.1 *Les canaux BK*

Ces canaux sont activés par la dépolarisation membranaire et l'élévation du calcium intracellulaire. Ils possèdent une conductance unitaire élevée : de 100 pS en conditions physiologiques jusque 250 pS en  $K^+$  symétrique (Pedarzani and Stocker, 2008) d'où leur nom BK pour Big  $K^+$  ou encore MaxiK. Ces canaux sont des tétramères constitués de sous-unités à 7 DTM.

Le rôle des canaux BK est essentiellement la création d'un feedback négatif agissant sur le potentiel et la concentration en calcium. La phase rapide de la post-hyperpolarisation (PHP) est générée principalement par les canaux BK (plus quelques autres canaux potassiques voltage-dépendants). La dépolarisation induite lors d'un PA entraîne l'activation des canaux BK qui vont, via une entrée d'ions  $K^+$ , hyperpolariser la membrane et donc fermer les canaux calciques voltage-dépendants afin de réduire l'entrée de calcium dans la cellule. Par sa nature, qui consiste donc à diminuer l'excitabilité cellulaire, cette conductance est impliquée dans beaucoup de phénomènes physiologiques comme par exemple : le contrôle de l'intervalle de temps entre deux potentiels d'actions et de la fréquence de décharge ou encore le tonus respiratoire. Un dysfonctionnement des canaux BK est, par exemple, impliqué dans certaines formes d'épilepsie, et peut-être d'autres pathologies telles que l'incontinence urinaire ou encore l'asthme (Cui et al., 2009).

Les canaux BK sont largement exprimés dans différents tissus périphériques comme les cellules chromaffines, les cellules ciliées de la cochlée et également dans les muscles lisses et striés. Au niveau du système nerveux central, du moins dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe, ils sont couplés avec des canaux calciques de type N (Loane et al., 2007). En revanche des expériences immunohistochimiques sur cerveau de rat indiquent que les BK s'assemblent en complexes macromoléculaires avec les canaux calciques voltage-dépendants :  $Ca_v1.2$  (type L),  $Ca_v2.1$  (type P/Q) et  $Ca_v2.2$  (type N). Ces assemblages constituent un complexe où les ions  $Ca^{2+}$  s'écoulant par les  $Ca_v$  vont activer les canaux BK avec une cinétique inférieure à la milliseconde (Berkefeld et al., 2006).

D'un point de vue pharmacologique, les bloqueurs de canaux BK sont l'iberiotoxine et la charybdotoxine qui se positionnent au dessus du pore afin de bloquer le courant potassique ( $K_d$ : 5 -10 nM). Parmi ces deux toxines, seule l'iberiotoxine est sélective car la charybdotoxine bloque également les canaux IK et Kv1.3 (Rauer et al., 2000). Des ammoniums quaternaires comme le TEA et le tetrabutylammonium (TBA) agissent également comme des bloqueurs de pore (Ghatta et al., 2006). La séquence des canaux BK est assez proche de celle des canaux Kv, la similitude la plus frappante étant la séquence en acides aminés chargés du segment S4 formant le senseur de voltage (Vergara et al., 1998). Cependant, une caractéristique unique aux canaux BK est la présence d'un segment transmembranaire supplémentaire (appelé S0) qui oriente le côté N-terminal du canal vers le cytoplasme et la présence d'un important domaine cytoplasmique comptant ~800 acides aminés (Cui et al., 2009).

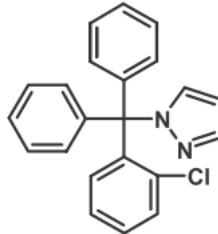
### 2.2.2 Les canaux IK

Les canaux IK (ou  $K_{Ca}3.1$ , auparavant aussi dénommés SK4) présentent une homologie importante avec les canaux SK (~50%), ils possèdent cependant des caractéristiques biophysiques et pharmacologiques légèrement différentes. En effet, leur conductance unitaire est un peu plus élevée avec des valeurs comprises entre 20 à 85 pS tout en restant bien inférieure à celle des canaux BK. Une caractéristique intéressante est que la sensibilité au calcium est la même pour les canaux IK et les canaux SK bien que la courbe d'activation soit plus aplatie, ce qui a pour conséquence qu'une faible concentration en calcium intracellulaire (~0.1  $\mu$ M) devrait commencer à activer les canaux IK tout en gardant les canaux SK fermés. A l'instar des canaux SK, les canaux IK possèdent un domaine de liaison à la calmoduline liant une unité de calmoduline servant de senseur calcique. Ce mécanisme est détaillé plus bas.

Une autre différence notable est l'absence de sensibilité des canaux IK à l'apamine et la *d*-tubocurarine. Par contre, la charybdotoxine bloque les canaux IK avec une affinité similaire aux canaux potassiques Shaker (Kv1.3) avec une  $IC_{50}$  de 2-28 nM, ce qui n'est pas le cas des canaux SK (Ishii et al., 1997). La maurotoxine est également un bloqueur puissant des canaux IK avec une  $IC_{50}$  de 1 nM. Contrairement à la charybdotoxine, la maurotoxine n'est pas un bloqueur de canaux BK ou SK (jusque 300 nM), mais par contre peut inhiber les canaux Kv1.1 (40 nM), Kv1.2 (0.8 nM) et Kv1.3 (150 nM). La modification de structure de



l'agent antimycotique clotrimazole dont l'IC<sub>50</sub> se situe entre 25 et 287 nM (Jensen et al., 2001), a conduit à la synthèse d'une petite molécule appelée TRAM-34 (figure 7) et qui présente une IC<sub>50</sub> de 20 nM vis-à-vis des canaux IK (Bradding and Wulff, 2009; Wulff et al., 2001).



**Figure 7 : Structure de TRAM-34.**

### 2.2.3 Les canaux SK

#### 2.2.3.1 Distribution des canaux SK

Les canaux SK (ou K<sub>Ca2</sub>) sont largement exprimés dans le système nerveux central. En fonction des zones, leur expression peut-être bien délimitée par sous-type où parfois être mixte.

Des expériences d'hybridation *in situ* (Stocker and Pedarzani, 2000) et d'immunohistochimie (Sailer et al., 2002) chez le rat ou la souris (Sailer et al., 2004) ont permis d'établir une cartographie précise. Les sous-types SK1 et SK2 sont fortement exprimés dans l'hippocampe et le cortex tandis que le sous-type SK3 est majoritaire dans l'hypothalamus, le thalamus et le tronc cérébral (Faber and Sah, 2007). Les sous-unités SK peuvent s'assembler pour former des multimères dans un système d'expression hétérologue (cellules HEK293) (Benton et al., 2003; Monaghan et al., 2004). Il semblerait cependant que les canaux natifs sont homomériques. Ceci a été montré pour SK3 dans les neurones dorsaux du nerf vague (hybridation *in situ*) (Pedarzani et al., 2000), pour SK2 dans l'hippocampe (immuno-histochimie) (Sailer et al., 2002) et pour SK3 au niveau des neurones dopaminergiques (single-cell RT-PCR) (Wolfart et al., 2001).

#### 2.2.3.2 Fonction des canaux SK

La fonction principale des canaux SK est de participer à la post-hyperpolarisation de durée moyenne (mPHP). Ils ont été caractérisés dans plusieurs types de neurones dans

lesquels ils peuvent moduler le mode de décharge des potentiels d'actions. Les canaux SK jouent donc un rôle important dans l'encodage du signal en concertation avec d'autres canaux (Pedarzani and Stocker, 2008). Ils sont par exemple présents au niveau des épines dendritiques où ils exercent un rôle de rétrocontrôle négatif sur les potentiels post-synaptiques excitateurs en facilitant le blocage des canaux NMDA par le  $Mg^{2+}$  et rendant ainsi plus difficile l'induction de potentialisation à long terme (Ngo-Anh et al., 2005).

La phase de PHP représente une période réfractaire pendant laquelle le potentiel membranaire est tellement négatif qu'il est très difficile de générer un nouveau potentiel d'action. Elle est composée de trois phases : rapide (2-5 ms), moyenne (50-100 ms) et lente (1 -2 s) (Storm, 1987). Le rôle des canaux SK est le contrôle de la fréquence et du mode de décharge. Ceci a notamment été démontré chez le rat dans les noyaux moteurs dorsaux du nerf vague (Pedarzani et al., 2000), dans les neurones dopaminergiques du mésencéphale (Waroux et al., 2005; Wolfart et al., 2001), dans les neurones serotonergiques du raphe dorsal (Rouchet et al., 2008), dans les couches CA1 (Stocker et al., 1999) et CA3 de l'hippocampe (Savic et al., 2001) ainsi que dans le ganglion cervical supérieur (Hosseini et al., 2001).

L'apamine, qui est le bloqueur spécifique des canaux SK, bloque une composante de la PHP de durée moyenne (mPHP). Un blocage complet de la mPHP par la toxine a déjà été rapporté dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe (Stocker et al., 1999). Cependant, d'autres études dans l'hippocampe ont démontré qu'outre le courant SK2 (Bond et al., 2004), les courants de type H (canaux HCN) et M (canaux KCNQ) étaient également impliqués dans la mPHP (Gu et al., 2005; Peters et al., 2005; Tzingounis and Nicoll, 2008). Il subsiste donc une controverse en ce qui concerne la contribution de conductances non-SK dans la phase de mPHP de ces neurones.

Les canaux impliqués dans la phase la plus longue de la PHP ne sont pas réellement connus. Bien que les canaux SK1 aient été proposés comme responsables de cette phase (Kohler et al., 1996; Vergara et al., 1998) certains auteurs nient l'implication des canaux SK1 dans la formation de la PHP lente en avançant l'argument que le courant SK1 enregistré dans certaines régions du cerveau était résistant à l'apamine. Ce type de résistance a été mis en évidence dans les cellules pyramidales du cortex (Villalobos et al., 2004). Une difficulté à répondre à cette question vient probablement du fait qu'il n'est pas encore possible d'exprimer le canal SK1 de rat dans des systèmes hétérologues.

### 2.2.3.3 La structure des canaux SK : comparaison avec d'autres canaux $K^+$

Les canaux SK font partie de la classe des canaux à 6 DTM. Les gènes codant pour les canaux SK ont été clonés et trois types de sous-unités ont été identifiées. Ces sous-unités montrent un degré d'homologie assez élevé avec cependant peu de similitude avec les autres canaux potassiques (Xia et al., 1998). L'assemblage en tétramères sous-tend la formation d'un pore par les DTM S5 et S6, chaque sous-unité possède une boucle p et la séquence formant le filtre de sélectivité (glycine-tyrosine-glycine) (figure 8).

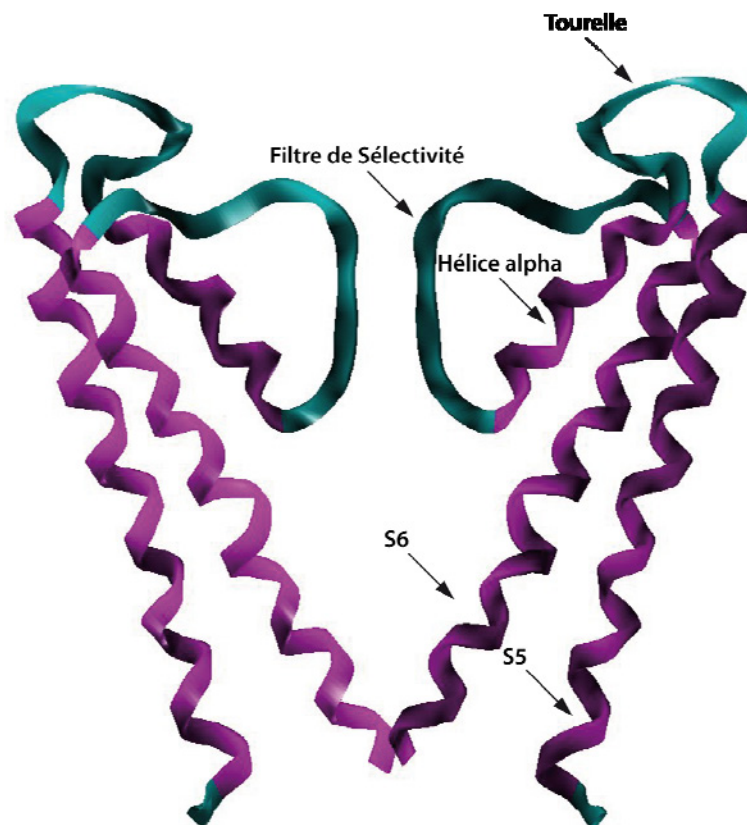


Figure 8 : Schéma représentant les domaines S5 et S6 de deux sous-unités.

La structure de  $K_v1.2$  récemment obtenue par cristallographie avec une résolution de 2.9 Å (Long et al., 2005a) est la structure élucidée dont, actuellement, se rapprocheraient le plus les canaux SK (figure 9).

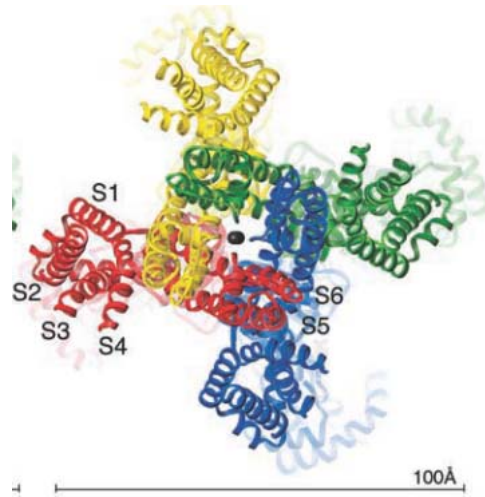


Figure 9 : Structure de Kv1.2 (d'après Long 2005a et al.)

Le « gating » (ouverture et fermeture d'un canal) des canaux voltage-dépendants ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ) est principalement attribué à 4 résidus arginine ou lysine séparés par 2 autres acides aminés au niveau du segment S4 (figure 10) (Long et al., 2005b; Yellen, 2002). Ces canaux possèdent donc 16 charges positives formant le senseur de voltage (MacKinnon, 2003). Les canaux SK, quant à eux, ne possèdent pas un nombre de charges suffisant au niveau de S4 et ne sont donc pas voltage-dépendants.

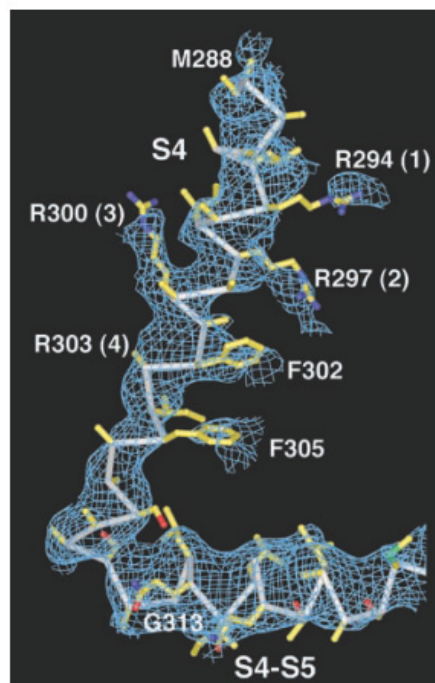


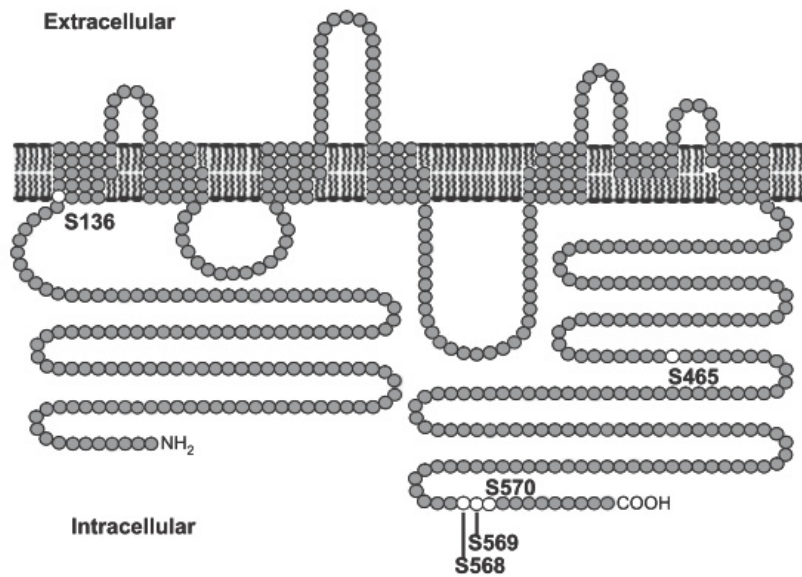
Figure 10 : Figure illustrant les acides aminés chargés au niveau du segment S4 de Kv1.2 (d'après Long et al., 2005a).

Cependant, le segment 4 des canaux SK possède malgré tout deux arginines qui semblent impliquées dans la formation de la structure tridimensionnelle du canal. L'alignement des séquences des canaux SK et ceux de la famille des « Shaker » ( $K_v1$ ) montre que la position de ces deux résidus correspond à l'Arg-368 et la Lys-374 faisant partie du senseur de voltage de ces derniers (Gao et al., 2008).

Trois acides aminés ont été identifiés comme cruciaux dans la formation de la structure des canaux SK : deux arginines sur S4 correspondant à l'Arg-368 et la Lys-374 des shakers ainsi qu'un acide glutamique sur S3 qui correspond à l'Asp-316. Il a été démontré sur SK3 que la mutation d'un de ces trois acides aminés entraînait un mauvais repliement de la protéine (Gao et al., 2008). Celle-ci est ensuite détectée par des protéines chaperonnes du réticulum endoplasmique (RE), envoyée vers la membrane du réticulum où elle est reconnue par Derlin-1 (protéine membranaire du RE permettant le transport de protéine mal repliée de la lumière du RE vers le cytoplasme), transloquée ensuite vers le cytosol où elle subit une polyubiquitination (protéines marqueurs de d'élimination) permettant sa reconnaissance par le complexe p97/Cdc48 qui la sépare de Derlin-1 et l'envoie vers un protéasome pour dégradation (Gao et al., 2008).

#### 2.2.3.4 *Organisation et régulation de la localisation membranaire des SK*

La phosphorylation des canaux potassiques permet de moduler la cinétique et la localisation cellulaire de ceux-ci. Des sites d'interactions avec la protéine kinase A (PKA) et C (PKC) ont notamment été identifiés chez  $K_v3.4$  et  $k_v1.2$  (Jonas and Kaczmarek, 1996). La partie C-terminale des canaux SK contient une série de sites pouvant être phosphorylés. La localisation de ces sites sur SK2 est montrée dans la figure 11 (Ren et al., 2006).



**Figure 11: Figure montrant par des cercles blancs les sites de phosphorylation (d'après Ren et al., 2006).**

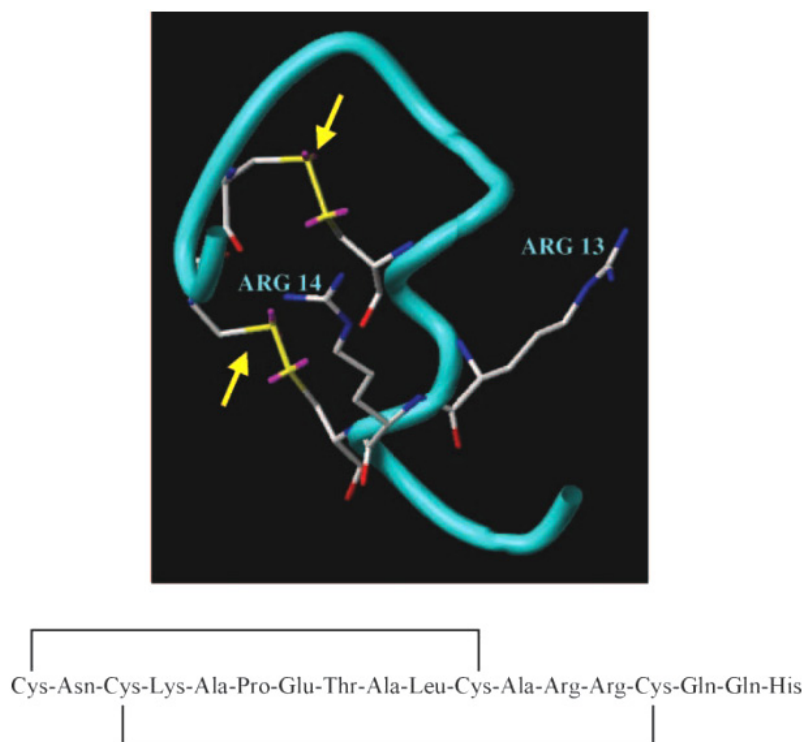
Une étude réalisée dans un système d'expression hétérologue (COS7) a permis d'identifier les sites phosphorylés par PKA et responsables de la régulation de la localisation des canaux au niveau membranaire. En effet, l'activation de la PKA par de la forskoline (50µM) causait une diminution importante (~ 65 % d'expression par rapport au contrôle) de l'expression de SK2 au niveau de la membrane tandis que l'utilisation d'un inhibiteur de PKA (le H89 à 10 µM) augmentait l'expression membranaire (~ 168 % par rapport au contrôle); les résidus phosphorylés étaient les Sérines 569, 568 et 570 (Ren et al., 2006).

Au niveau membranaire, les canaux SK, ou tout du moins SK2, s'assemblent avec des protéines kinase CK2 (CK2) et des protéines phosphatase 2A (PP2A). Il semblerait que la calmoduline, constitutivement liée au canal, puisse subir une phosphorylation par CK2 réduisant la sensibilité au Ca<sup>2+</sup> et donc diminuant l'activité du canal. PP2A est également liée au canal et permet de contrebalancer l'effet de la CK2. Dans des expériences en patch-clamp, l'ajout d'un inhibiteur de la CK2, le TBB (4,5,6,7-tetrabromo-2-azabenzimidazole), déplace la courbe de l'EC<sub>50</sub> du Ca<sup>2+</sup> de 0.53 µM vers 0.28 µM. De plus il a été démontré que la phosphorylation de la calmoduline ne peut s'effectuer que lorsque le canal est dans son état fermé. Les canaux SK2 sont donc assemblés en un complexe protéique destiné à réguler de façon dynamique la sensibilité au Ca<sup>2+</sup> (Allen et al., 2007)

### 2.2.3.5 Pharmacologie des canaux SK

Dans le courant des années 80, une multitude d'articles décrivaient déjà qu'un composant du venin d'abeille (*Apis Mellifera*) appelé apamine (Vincent et al., 1975) pouvait bloquer un courant potassique activé par le calcium ( $P_{K(Ca)}$ ) dans différents tissus comme le foie, les muscles lisses intestinaux, les neuroblastomes, les muscles striés et les neurones (Cook and Haylett, 1985). Le futur bloqueur de référence des SK était donc connu. Il a cependant fallu attendre jusqu'en 1986 pour que Blatz et Magleby décrivent ces canaux (Blatz and Magleby, 1986). A l'époque, il était établi que la post-hyperpolarisation (PHP) observée dans beaucoup de types cellulaires était provoquée par l'ouverture d'une conductance potassique par le calcium. Les canaux BK étaient d'ailleurs déjà décrits pour leur participation à ce phénomène. Cependant, il fut observé que dans certaines cellules excitables, le courant BK ne contribuait pas majoritairement au courant de la PHP. En effet, ce courant était bloqué par l'apamine et était résistant au tetraethylammonium (TEA) (5 mM). Or, les canaux BK sont insensibles à l'apamine et 5 mM de TEA bloque les courants BK sans réduire la PHP. Blatz et Magleby réalisèrent des enregistrements de type *single-channel* sur des cultures de cellules de muscles squelettiques de rat et parvinrent à identifier des canaux de faible conductance unitaire (10-14 pS), produisant un courant bloqué par l'apamine et insensibles à 5 mM de TEA.

L'apamine est un peptide comptant 18 acides aminés d'un poids moléculaire de 2027,34 Da. Sa structure tridimensionnelle est rigidifiée par la présence de deux ponts disulfures. Jusqu'à présent, il n'existe pas de données cristallographiques sur sa structure. Cependant, plusieurs études en RMN et en bioinformatique ont permis de se rapprocher de la réalité (Bystrov et al., 1980; Pease and Wemmer, 1988; Wemmer and Kallenbach, 1983) et également de comparer la structure de l'apamine (figure 12) avec celle d'autres bloqueurs SK comme l'UCL 1684 et d'en déduire ainsi un pharmacophore (Dilly et al., 2005).



**Figure 12 : Structure et séquence de l'apamine, avec les ponts disulfures indiqués par des flèches (d'après Dilly et al. 2005).**

Aux côtés de l'apamine, d'autres molécules ont été développées, soit pour activer les canaux SK, soit pour les bloquer. Ces molécules sont de nature peptidique ou organique. Les peptides agissant sur les SK sont tous des bloqueurs de courant. Il n'existe à ce jour pas d'activateur décrit. En ce qui concerne les bloqueurs peptidiques naturels, les plus répandus dans la littérature proviennent du venin de différents scorpions. Il s'agit du PO5 (*Androctonus mauretanicus mauretanicus*), de T<sub>SK</sub> (*Tityus serrulatus*), de la Tamapine (*Mesobuthus tamulus*) et de la Leiurotaxine I aussi appelée Scillatoxine (*Leirus quinquestriatus hebraeus*). Ces toxines sont actives à des concentrations nanomolaires. Une d'entre elles, la tamapine est sélective pour SK2 en étant 1750 et 70 fois plus puissante par rapport à SK1 et SK3 respectivement (Pedarzani et al., 2002) .

La leiurotaxine, le PO5 et l'apamine partagent un motif commun dans leur séquence. RXCQ a été rapporté comme étant important pour la liaison de ces peptides aux canaux SK (Sabatier et al., 1994; Sabatier et al., 1993). La leiurotaxine possède une méthionine en position 7 (lui conférant le motif RMCQ). Le remplacement de cette méthionine par un acide aminé non-naturel, le DAB (di-aminobutanoic acid) dans le Lei-DAB, permet à cette dernière toxine de garder son activité vis-à-vis de SK2 (IC<sub>50</sub> ~ 3.8 nM sur lignées cellulaires) mais de voir son activité drastiquement réduite sur SK3 (IC<sub>50</sub> ~ 2500 nM) et SK1 (IC<sub>50</sub> ~ 6000 nM)



(Shakkottai et al., 2001). Le Lei-DAB peut donc être considéré comme un bloqueur sélectif des canaux SK2 par rapport aux autres types SK.

Les bloqueurs de nature organique décrits dans la littérature sont le dequalinium, la *d*-tubocurarine, la bicuculline quaternisée et la N-méthyl-laudoanine. Ces composés possèdent des IC<sub>50</sub> de l'ordre du μM. Les bis-quinolinium cyclophanes peuvent donner naissance à des molécules puissantes, notamment les UCL 1684 et 1848 ayant des IC<sub>50</sub> de l'ordre du nM voire une centaine de pM (UCL 1848 vis-à-vis de SK2). Au niveau des inhibiteurs de courant SK, nous devons également citer le NS8593 qui déplace la courbe d'activation par le calcium sur SK3 (Strobaek et al., 2006). Les activateurs de courant SK sont tous de nature organique, les plus connus étant l'1-EBIO, le Dichloro-EBIO et le NS309 (Strobaek et al., 2004). Un activateur intéressant est le CyPPA qui augmente la sensibilité au calcium de hSK3 et hSK2 (légèrement moins pour ce dernier) mais pas celle de hSK1 (Hougaard et al., 2007).

Le tableau de la page suivante repris d'une revue récente résume les différentes IC<sub>50</sub> décrites dans la littérature (Weatherall et al., 2010).

	IC <sub>50</sub>	K <sub>Ca</sub> 2.1	K <sub>Ca</sub> 2.2	K <sub>Ca</sub> 2.3
<i>Toxins</i>				
Apamin	nM	0.70 <sup>8</sup> , 1.3 <sup>17</sup> , 2.9 <sup>7</sup> , 5.1 <sup>7</sup> , 7.7 <sup>6</sup> , 8 <sup>14</sup> , 12.2 <sup>6</sup> , >100 <sup>1,2</sup> , 28 <sup>11</sup>	0.027 <sup>8</sup> , 0.063 <sup>1</sup> , 0.083 <sup>7</sup> , 0.095 <sup>16</sup> , 0.07 <sup>17*</sup> , 0.14 <sup>14</sup>	1.4 <sup>10</sup> , 2 <sup>2</sup> , 4 <sup>8</sup> , 0.63 <sup>9</sup> , 1 <sup>17</sup> , 1.1 <sup>14</sup> , 13.2 <sup>13</sup> , 19.1 <sup>13</sup>
PO5	nM			25 <sup>12</sup>
Leurotoxin-I (Scyllatoxin)	nM	80 <sup>7</sup> , 325 <sup>12</sup>	0.29 <sup>7</sup>	8.3 <sup>10</sup> , 1.1 <sup>12</sup>
Lei-Dab7	nM	6000 <sup>12</sup>	5.5 <sup>12</sup>	2500 <sup>12</sup>
Tamapin	nM	42 <sup>15</sup>	0.024 <sup>15</sup>	1.7 <sup>15</sup>
Tsk	nM			198 <sup>12</sup>
<i>Organic compounds</i>				
Quaternary bicuculline salts	μM	1.4 <sup>4</sup> , 15.9 <sup>7</sup>	1.1 <sup>4</sup> , 25 <sup>7</sup>	6.6 <sup>9</sup>
Dequalinium	μM	0.44 <sup>7</sup> , 0.48 <sup>6</sup>	0.16 <sup>7</sup> , 0.35 <sup>5</sup>	30 <sup>13</sup>
d-Tubocurarine	μM	23.5 <sup>6</sup> , 27 <sup>7</sup> , 76.2 <sup>1</sup> , 354 <sup>2</sup>	2.4 <sup>1</sup> , 5.4 <sup>2</sup> , 17 <sup>7</sup>	210 <sup>13</sup>
UCL-1684	nM	0.76 <sup>7</sup>	0.36 <sup>7</sup> , 0.28 <sup>3</sup>	5.8 <sup>10</sup> , 9.5 <sup>3</sup>
UCL-1848	nM	1.1 <sup>6</sup>	0.12 <sup>10</sup> , 0.11 <sup>16</sup>	2.1 <sup>10</sup>
Calyculin A	nM			240 <sup>13</sup>
Okadaic acid	nM			506 <sup>13</sup>
Amitriptyline	μM		54.8 <sup>5</sup>	39 <sup>9</sup>
Carbamazepine	μM		14.5 <sup>5</sup>	
Chlorpromazine	μM		12.8 <sup>5</sup>	0.6 <sup>9</sup> , 33 <sup>13</sup>
Cyproheptadine	μM	33 <sup>14</sup>	15.3 <sup>5</sup>	9.2 <sup>9</sup>
Desipramine	μM			29 <sup>13</sup>
Fluoxetine	μM	9 <sup>18</sup>	7 <sup>18</sup>	17 <sup>18</sup> , 25 <sup>18</sup>
Fluphenazine	μM			13 <sup>13</sup>
Imipramine	μM		21.7 <sup>5</sup>	44 <sup>13</sup>
Nortriptyline	μM			20 <sup>13</sup>
NS8593	nM	415 <sup>19</sup>	598 <sup>19</sup>	77 <sup>20</sup> , 91 <sup>19</sup> , 726 <sup>19</sup>
NS11757	nM			9 <sup>20</sup>
Promethazine	μM			31 <sup>13</sup>
Tacrine	μM		53.7 <sup>5</sup>	
TEA	mM	14.6 <sup>2</sup> , 14.1 <sup>21</sup>	2.8 <sup>21</sup>	8.7 <sup>21</sup>
Trifluoperazine	μM		7.6 <sup>5</sup>	48 <sup>13</sup>

**Tableau 2 : Le système d'expression utilisé est donné par un code couleur : oocytes de Xénope en bleu, HEK293 en noir, COS-7 en orange et CHO en rouge. Les papiers référencés sont les suivants : 1.(Kohler et al., 1996), 2. (Ishii et al., 1997b), 3. (Fanger et al., 1999), 4. (Khawaled et al., 1999) 5. (Dreixler et al., 2000), 6. (Shah and Haylett, 2000) 7. (Strobaek et al., 2000), 8. et 9. (Grunnet et al., 2001a; Grunnet et al., 2001b) 10. (Hosseini et al., 2001), 11. (Ro et al., 2001), 12. (Shakkottai et al., 2001), 13. (Terstappen et al., 2001), 14. (Dale et al., 2002), 15. (Pedarzani et al., 2002), 16. (Benton et al., 2003), (17). (Castle et al., 2003), (18). (Terstappen et al., 2003), (19). (Strobaek et al., 2006), (20). (Sorensen et al., 2008b), (21). (Monaghan et al., 2004).**

### 2.2.3.6 Mécanisme d'activation par le $Ca^{2+}$

Comme nous l'avons vu, les canaux SK ne sont pas voltage-dépendants. L'ouverture des canaux SK est couplée à l'augmentation de la concentration cytoplasmique du  $Ca^{2+}$ . Les  $EC_{50}$  trouvées dans la littérature s'échelonnent de 300 à 700 nM (Kohler et al., 1996; Xia et al., 1998). Les ions  $Ca^{2+}$  se lient à une molécule de calmoduline (CaM) qui est constitutivement liée à l'extrémité C-terminale cytoplasmique de chaque sous-unité SK. La partie de cette séquence est appelée CaMBD (« calmodulin binding domain »). La CaM possède 4 poches permettant de lier les ions calciques. Les deux sites du côté C-terminal de la CaM sont responsables de l'interaction non dépendante du calcium avec la protéine du canal (Keen et al., 1999). Les courbes d'activation des canaux SK par le calcium donnent des coefficients de Hill de  $\sim 4$ , indiquant ainsi qu'un mécanisme de coopérativité entre les 4 CaMBD existe dans l'activation des canaux (Xia et al., 1998). La cristallisation du complexe CaMBD-CaM (résolution 1.60 Å) a permis d'échafauder une hypothèse concernant le mécanisme d'ouverture du canal. Il s'agirait d'une dimérisation du complexe CaMBD-CaM en présence de calcium. La formation de ce dimère entre deux sous-unité entraînerait une rotation entre les domaines S6 et l'ouverture du pore (Schumacher et al., 2001) (figure13).

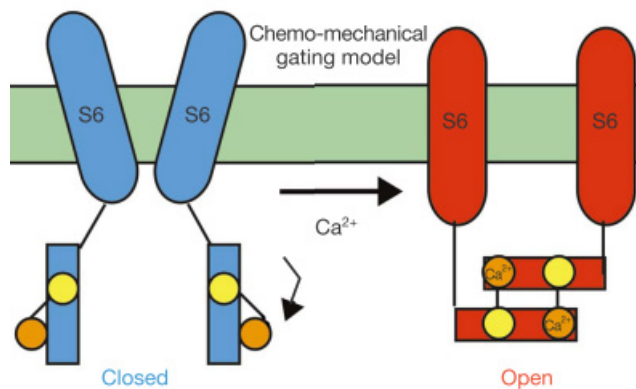


Figure 13 : Représentation du mécanisme d'ouverture probable des canaux SK par liaison aux CaM (d'après Shumacher et al. 2001).

A ce jour, il n'existe pas d'autre modèle qui expliquerait le mécanisme d'ouverture des canaux SK. Il faut faire remarquer qu'une étude basée sur la technique du SCAM (Substituted Cystein Accessibility Method) a permis de montrer que la localisation du « gating » des canaux SK est très profonde au niveau de la région intérieure du pore près du filtre de sélectivité. Il a d'ailleurs été proposé que le filtre de sélectivité pourrait lui-même jouer le rôle

de barrière (Bruening-Wright et al., 2007). De plus, une étude réalisée sur les canaux IK a permis de montrer l'importance d'un résidu hydrophobe dans le « gating » de ces canaux. En effet, la mutation d'une valine proche du filtre de sélectivité (position 282 sur IK et 391 pour rSK2) en un acide aminé moins hydrophobe conduit le canal à être ouvert en permanence en absence de  $\text{Ca}^{2+}$  (Garneau et al., 2009). Cette seconde approche permet de renforcer l'hypothèse d'un « gating » très proche du filtre de sélectivité pour les canaux SK, bien qu'il ne s'agisse pas ici d'une expérience directement sur les SK, mais bien sur un canal semblable. Une autre approche permet également de renforcer l'hypothèse d'un « gating » proche du filtre de sélectivité. En effet, une équipe travaillant sur des bloqueurs/activateurs de canaux SK intracellulaires a développé une molécule capable d'ouvrir les canaux SK. En effet, le GW542573X est capable d'ouvrir les canaux hSK1 avec une  $\text{EC}_{50}$  de  $\sim 8 \mu\text{M}$  en présence d'une concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  normalement non-activatrice (200 nM). Les canaux hSK2 et hSK3 sont 10 fois moins sensibles à ce composé. Le site d'interaction de cette molécule a été identifié comme étant le résidu sérine 293 située sur S5 dans une partie profonde du pore (Hougaard et al., 2009). Cette information renforce l'hypothèse émise par (Bruening-Wright et al., 2007) d'un gating proche du filtre de sélectivité.

#### 2.2.3.7 *Le phénomène de rectification entrante*

Les courants SK enregistrés en potassium symétrique devraient répondre de manière linéaire aux variations de potentiel. Dans la pratique, ils ne répondent cependant pas à cette assumption et sont caractérisés par le phénomène de rectification entrante (Soh and Park, 2001).

Dans le cadre d'enregistrements sur cellules HEK293 transfectées par une sous-unité SK, le courant enregistré est quasi pur, il suit la relation  $I_k = G_k(V - E_k)$  et est fréquemment réalisé en potassium symétrique. Cette condition d'enregistrement permet d'éviter la non-linéarité de l'équation de GHK (Clay, 2009) où la conductance devient plus grande quand le flux ionique va de la partie la plus concentrée vers la partie moins concentrée (Hille, 2001). Cela simplifie la description de  $I_{\text{SK}}$  en une simple loi d'Ohm vu que  $E_k = 0$ .

Malgré cette simplification, un courant SK ne suit pas de façon linéaire le potentiel appliqué car il subit le phénomène de rectification entrante. Une telle propriété signifie qu'à force motrice équivalente mais de signe opposé, le courant entrant enregistré sera supérieur en

valeur absolue au courant sortant. Ce phénomène n'est ici pas lié au passage de charges qui sont ralenties par effet de champs quand elles se dirigent vers un milieu plus concentré en la même espèce ionique. Il s'agit en fait d'une compétition entre les ions  $K^+$  et des ions divalents pour un site localisé juste en dessous du filtre de sélectivité et qui fait donc vraisemblablement partie du chemin emprunté par les  $K^+$  dans le sens sortant. Une série d'ions divalents a été testée amenant des valeurs de  $K_i$  suivante (tableau 3) :

	$Ba^{2+}$	$Sr^{2+}$	$Ca^{2+}$	$Mg^{2+}$
$K_i$ (en $\mu M$ )	~ 0.6	~ 3.8	~ 19.3	~ 180
Concentrations intracellulaires basales ( $\mu M$ ) Culture de neurones du ganglion dorsal (rat)	-	-	0.084	680

**Tableau 3 : Valeurs de  $K_i$  d'après (Soh and Park, 2001) et concentrations intracellulaires d'après (Gotoh et al., 1999).**

Au vu de la concentration intracellulaire de  $Mg^{2+}$  et de son  $K_i$ , il est clair que cet ion joue un rôle physiologique au niveau du courant SK.

La découverte du site d'interaction des ions divalents fut précédée par la mise en évidence de deux points de similitude entre les canaux SK et  $K_{ir}$  (canaux potassiques à rectification entrante à 2DTM). Premièrement, la rectification entrante est produite par un blocage voltage-dépendant par les ions  $Mg^{2+}$  au niveau intracellulaire. Deuxièmement, la rectification entrante est dépendante de la concentration en  $K^+$  extracellulaire. Ce phénomène est appelé le « *trans knockoff* » d'ions bloquants par le  $K^+$  extracellulaire (Soh and Park, 2001). Un phénomène semblable a été également observé dans une expérience sur axone géant de calmar où la concentration externe de  $K^+$  pouvait diminuer le blocage par le TEA intracellulaire agissant sur des canaux potassiques voltage-dépendant (Armstrong and Binstock, 1965).

La localisation du site d'interaction entre les ions divalents et le pore fut identifiée dans les canaux  $K_{ir}$  au niveau de leur segment M2. L'alignement entre le segment S6 des canaux SK et le segment M2 des  $K_{ir}$  a permis d'identifier la position probable du site d'interaction dans ceux-là. En effet, deux acides aminés hydrophiles T379 et T387 ont été localisés chez SK2 au niveau de la région prédite dans S6. De plus, la T387 correspond à la position du site d'interaction sur différents canaux  $K_{ir}$ . Cependant, la mutation systématique

en Ala des sites correspondants sur SK2 n'a pas montré de modification de la courbe I-V. La seconde tentative se base sur l'alignement de SK2 avec un canal provenant de *streptomyces lividans*, le KcsA, qui fut cristallisé avec des ions  $Ba^{2+}$  (Jiang and MacKinnon, 2000). En effet, l'alignement des deux séquences a permis d'identifier un autre acide aminé hydrophile. Il s'agit d'une S359 qui est alignée avec une T75 du canal KcsA localisée près du site de liaison du  $Ba^{2+}$  de ce canal.

La mutation de ce résidu en alanine a permis de rendre la rectification plus linéaire et de diminuer l'affinité des cations intra-cellulaires. Le site responsable de la rectification entrante était donc identifié et localisé juste en dessous du filtre de sélectivité (Soh and Park, 2002).

#### 2.2.3.8 Sélectivité des canaux SK

La sélectivité de canaux ioniques fait partie de leurs caractéristiques biophysiques qui vont déterminer leur rôle physiologique au sein d'une cellule excitable. En effet, l'équation de GHK nous montre que la concentration, de part et d'autre de la membrane, est un facteur majeur dans l'établissement du potentiel membranaire. De plus, une perméabilité sélective pour un type ionique est également primordiale. En effet, comment un canal potassique pourrait-il jouer son rôle dans la repolarisation membranaire s'il est fortement perméable aux ions sodiques ?

Comme évoqué précédemment, les canaux potassiques sont dotés d'une séquence d'acides aminés formant un pore hautement sélectif aux ions  $K^+$ . La sélectivité des canaux SK est un sujet quelque peu controversé. En effet, un groupe travaillant sur le canal cloné rSK2 a mis en évidence que le potentiel d'inversion du canal rSK2 s'éloignait de la valeur théorique obtenue par l'équation de Nernst (Shin et al., 2005). Cela signifie que le courant enregistré n'était pas purement potassique. En effet, leurs expériences de patch-clamp (Inside/out en voltage contrôlé) montrent, en l'absence de  $Na^+$ , un potentiel d'inversion de -100 mV quand les ions  $K^+$  intracellulaires sont remplacés par du NMDG<sup>+</sup> (N-méthyl-D-glucamine) qui joue le rôle d'une entité ionique ne pouvant franchir le canal. Cependant, ils constatèrent un potentiel d'inversion de -60 mV quand le  $K^+$  intracellulaire était remplacé par du  $Na^+$ . Cette expérience montre que des ions  $Na^+$  peuvent passer à travers les canaux SK. Les ratios de perméabilité ( $P_X/P_K$ ) obtenus par Shin et al. sont les suivants :  $K^+$  (1.0) >  $Rb^+$  (0.80) >  $NH_4^+$

(0.19) ~ Cs<sup>+</sup> (0.19) > Li<sup>+</sup> (0.13) > Na<sup>+</sup> (0.12). Ces résultats, obtenus notamment dans des enregistrements sur cellules CHO transfectées, ne concordent cependant pas avec les résultats obtenus lors d'une étude antérieure dans laquelle les enregistrements furent effectués sur des cellules chromaffines de rats. Les valeurs de  $P_X/P_K$  obtenues dans cette étude sont TI<sup>+</sup> (1.87) > K<sup>+</sup> (1.0) > Rb<sup>+</sup> (0.81) > Cs<sup>+</sup> (0.16) > NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (0.11) tandis qu'il a été conclu que les ions Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> et méthylamine ne pouvaient passer à travers le canal (Park, 1994). D'après Shin et al., la différence entre les deux résultats pourrait s'expliquer par le fait que les courants mesurés par Park et al. montraient un run-down très rapide quand le potassium externe était remplacé par des ions moins perméants entraînant la mesure de courants de faibles intensités (< 40 pA).

Bien que les canaux SK partagent avec d'autres canaux potassiques la séquence hautement homologue TXXTXGYG (appelée aussi séquence signature des canaux potassiques), une hypothèse concernant leur défaut de sélectivité a été émise (Shin et al., 2005). La séquence des canaux SK correspondant aux 8 acides aminés de la séquence signature est TFLSIGYG, cette dernière diffère d'un acide aminé par rapport à la séquence signature des canaux potassiques. Bien que S et T aient une structure proche, la T occupe plus de volume que la S et est hydrophobe (Livingstone and Barton, 1993). Les auteurs n'ont cependant pas relevé cette différence, ils ont par contre noté que la séquence SIGYG est précédée par un acide aminé hydrophobe, une L, ce qui n'est pas le cas dans d'autres canaux potassiques. Cette position est en effet souvent occupée par une T ou une S. Ils ont donc muté la L en une T afin d'augmenter la sélectivité vis-à-vis du potassium d'un canal SK2. Cette tentative a cependant échoué. La sélectivité des canaux SK reste donc un domaine nécessitant encore des investigations.

### 3 Objectifs du travail

Comme le lecteur l'aura constaté, la connaissance des propriétés moléculaires et pharmacologiques des canaux SK est assez avancée. Cependant, dans l'optique d'une évaluation de ces canaux en tant que cible de futurs médicaments, de nombreuses recherches sont encore nécessaires. En dehors de peptides, nous ne disposons pas encore de bloqueurs extracellulaires sélectifs d'un sous-type donné. De plus, le mécanisme moléculaire d'action de l'apamine et des bloqueurs non-peptidiques et le substratum de l'affinité préférentielle de la première pour SK2 n'étaient pas connus lorsque nous avons entamé notre travail.

Notre objectif a été de combler certaines de ces lacunes. Etant donné la présence d'histidines en nombre variable dans la région du pore de ces canaux, nous nous sommes demandé quelle pourrait être l'influence d'une acidification du pH externe sur leurs propriétés. Nous nous sommes ensuite penchés en détail sur le site d'action des bloqueurs, notamment en raison de l'indice d'une interaction en dehors du pore qui a été récemment décrite dans la littérature. Enfin, le hasard des recherches menées dans notre laboratoire nous a permis d'établir le caractère de bloqueur d'un agoniste des récepteurs  $\sigma$ , la 1,3-di-*o*-tolyl-guanidine.



## 4 Méthodologie générale

Pour faciliter la lecture, certaines méthodologies ont été décrites dans la section « résultats ».

### 4.1 Electrophysiologie

Les pipettes en borosilicate provenant des capillaires de référence KG-33 (Friedrich and Dimmock, CT, USA) ou de référence 1403513 (Hilgenberg, Malsfeld, Germany) ont été fabriquées à l'aide d'étireuses verticales de type P-87/2000 (Sutter Instruments, Novato, CA, USA) ou d'une étireuse PC-10 (Narishige, London, UK). Les pipettes obtenues étaient ensuite polies à l'aide d'une microforge de type MF-830 (Narishige, London, UK). La résistance des pipettes devait se situer entre 2-4 M $\Omega$  afin d'être acceptée pour expérimentation.

Les expériences de « patch-clamp » ont été réalisées à l'aide d'un amplificateur EPC-10<sup>®</sup> (Heka, Lambrecht, Germany) piloté par le logiciel Patchmaster<sup>®</sup> (Heka, Lambrecht, Germany) en mode voltage contrôlé. Les électrodes utilisées étaient de type Ag/AgCl avec l'utilisation d'une électrode de référence sous forme de « pellet ». Le bon état de l'électrode d'enregistrement était vérifié systématiquement par contrôle visuel du dépôt de chlorure d'argent (noir) sur l'électrode et re-chloruré si nécessaire. Les courants capacitifs dus à la pipette, ainsi que ceux provoqués par la cellule en mode cellule entière ont été corrigés et les expériences reprises ont une résistance série ne dépassant pas 8 M $\Omega$ . La fréquence d'enregistrement était de 20 kHz et les traces enregistrées ont été directement filtrées par le filtre passe-bas de l'amplificateur dont la fréquence de coin était de 1 kHz, la différence entre la fréquence d'enregistrement et de filtrage dépasse de loin les préceptes du théorème de Nyquist qui démontre que la fréquence d'échantillonnage doit au minimum être le double de la fréquence de filtration.

Les boîtes de Pétri contenant les cellules HEK-293 étaient placées directement sous un microscope inversé équipé d'une lampe à fluorescence (Axiovert 25<sup>®</sup>, Carl Zeiss SA, Zaventem, Belgium). Un système de perfusion général par gravité (~2 ml/min) permettait de superfuser en continu les cellules en milieu extracellulaire frais. Les expériences ont été réalisées à température ambiante (21 – 24 °C).

Les applications des différentes drogues ont été réalisées à l'aide d'un système de perfusion focale de 8 canaux (VM8<sup>®</sup>, Ala scientific instruments, Westbury, NY, USA). Ce dernier permet l'application de drogue directement sur la cellule testée à l'aide de la tête d'application de type QMM MicroManifolds<sup>™</sup>, dont les diamètres interne et externe sont de 100  $\mu\text{M}$  et 230  $\mu\text{M}$ , respectivement. Une pression de 0.25 bar était appliquée par un régulateur de pression PR-10 afin de permettre au liquide de sortir de la tête d'application. Le premier canal du système de perfusion était systématiquement rempli de la solution extracellulaire afin de vérifier que la pression n'altérait pas par elle-même le courant SK.

Toutes les applications de drogues étaient pilotées automatiquement par Patchmaster via une interface TIB 14 S (Heka, Lambrecht, Germany).

Le micromanipulateur utilisé pour les expériences était un PatchStar<sup>®</sup> (Scientifica Ltd., East Sussex, UK).

Toutes les expériences de patch-clamp présentées dans ce travail ont été effectuées en mode voltage contrôlé. Les mesures de blocage se sont toutes effectuées à -80 mV, potentiel auquel les  $K_v$  ne sont pas activés. Nos mesures de cinétique ont été effectuées à -50 mV pour des raisons techniques. En effet, appliquer une *driving force* supérieure à -50 mV pendant plusieurs secondes entraîne généralement la mort cellulaire. Il est cependant probable que les canaux  $K_v$  soient inactivés pendant ces enregistrements de longue durée. Par ailleurs, le potentiel étant constant, la cinétique de blocage ne devrait pas être entachée par l'activation de canaux non-SK. Les mesures réalisées pour les expériences sur le pH ont été effectuées à -60 mV.

#### 4.2 Culture cellulaire

Les cellules de type HEK-293 (Human Embryonic Kidney) ont été cultivées dans du DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) contenant 10% de sérum foetal de veau et 1% d'un mélange pénicilline/streptomycine (Invitrogen, Merelbeke, Belgium). 48 à 72 heures avant la transfection, les cellules étaient placées dans des boîtes de Pétri de 35 mm de marque Falcon.

La transfection des plasmides a été réalisée à l'aide d'une solution de PEI (polyéthylèneimine, Alfa Aesar) préparée dans le laboratoire dans de l'eau milli-Q à la concentration de 0.2 µg/µl. Les aliquots ont été conservés au congélateur (-18 °C) tandis que la solution utilisée quotidiennement pour les transfusions était stockée dans un réfrigérateur pour une durée de maximum 1 mois pour éviter une perte d'efficacité.

#### 4.3 Plasmides

Les canaux sauvages utilisés étaient les rK<sub>ca</sub>2.2 (KCNN2) (numéro GeneBank : NM\_019314) et hK<sub>ca</sub>2.3 (KCNN3) (numéro GeneBank : AF031815) insérés dans des vecteurs plasmidiques de types pcDNA3 (Invitrogen) et pFlagCMV2 (Sigma-Aldrich) respectivement. Le plasmide rK<sub>ca</sub>2.2 a été donné par le Dr Len Kaczmarek (Yale University) et le hK<sub>ca</sub>2.3 a été sous-cloné à l'Université de Bristol. Ces deux plasmides possèdent un promoteur de type « cytomegalovirus immediate-early promoter » qui permet l'expression massive de la protéine dans des cellules de mammifères, ainsi qu'un gène de résistance à l'ampicilline. Un plasmide codant pour l'EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) a systématiquement été co-transfecté avec les canaux pour repérer par fluorescence les cellules ayant incorporé les plasmides. Ce plasmide utilise un gène de résistance à la kanamycine.

L'amplification des plasmides a été réalisée à l'aide de trois kits provenant de Qiagen : QIAprep<sup>®</sup> Miniprep, Maxiprep et Megaprep. Le choix du kit a été réalisé en fonction des besoins en ADN. Le kit Miniprep pour vérifier la séquence d'un plasmide ayant subi une mutation, le kit Maxiprep pour la transfection de cellules HEK293 destinées à l'électrophysiologie et finalement le kit Megaprep destiné à la transfection des mêmes cellules destinées à la préparation membranaire en vue des expériences de *binding*. Le principe de base de ces kits consiste en une étape de transformation de bactéries compétentes avec le plasmide que l'on souhaite amplifier suivie d'une culture sur LB (Lysogeny Broth) gélifié contenant l'antibiotique de sélection, ensuite une amplification d'une colonie obtenue. Les bactéries subissent ensuite une lyse en milieu alcalin suivie d'une neutralisation qui provoque la précipitation de l'ADN génomique, des protéines et des débris cellulaires. L'ADN plasmidique est ensuite lié sur une colonne en résine anionique puis lavé par un tampon salin. Cette étape de purification est suivie par l'élution de l'ADN qui est ensuite précipité par de l'isopropanol et centrifugé. L'étape finale consiste en un lavage par de l'éthanol à 70 % pour

éliminer les sels précipités suivi d'un séchage de l'ADN et de la mise en solution dans un tampon TE (Tris et EDTA).

La mesure de la quantité d'ADN obtenue s'effectue par une mesure d'absorbance à 260 nm ( $A_{260}$ ) tandis qu'une mesure de l'absorbance à 280 nm ( $A_{280}$ ) permet de mesurer principalement la présence de résidus tyrosine et tryptophane et permet d'estimer la contamination en protéines.

#### 4.4 Mutagenèse dirigée

Les expériences de mutagenèse dirigée ont été effectuées à l'aide du kit Quickchange-II-XL<sup>®</sup> (Stratagene - Agilent Technologies) et vérifiées par séquençage. Le design des primers possédant la mutation a été réalisé par le logiciel on-line de Stratagene (Primer Design Program) et acheté chez Invitrogen.

La mutagenèse commence par une PCR permettant de séparer l'ADN double brin contenant le gène d'intérêt et un excès de primers contenant la mutation. Une enzyme thermiquement stable appelée *Pfu DNA* polymérase permet l'élongation vers le côté 5' à partir du primer. L'opération est répétée pendant plusieurs cycles. A la fin de la PCR, nous sommes donc en présence d'un mélange d'ADN contenant la mutation et d'ADN de départ. Cependant, l'ADN de départ provient de bactérie et est dès lors méthylé, contrairement au produit de la PCR. Une enzyme de restriction (*Dpn I*) est ajoutée au mélange pour digérer les brins méthylés (les ADN parents qui ne contiennent pas la mutation). Des bactéries compétentes sont ensuite transformées à l'aide de ce plasmide et déposées dans une boîte de pétri contenant du LB gélifié par de l'agar et l'antibiotique de sélection. La boîte est placée dans un incubateur pour une durée d'une douzaine d'heures. Une colonie isolée est ensuite sélectionnée et mise en culture dans 1.5 ml de milieu LB pendant une douzaine d'heures également. Les plasmides supposés contenir la mutation sont extraits et purifiés à l'aide du kit QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep (Qiagen).

#### 4.5 « Curve fitting »

Les données ont été analysées à l'aide de Graphpad Prism 5.1<sup>®</sup> (Graphpad Software) et d'Origin<sup>®</sup> (Microcal Software<sup>®</sup>). La méthode classique de « fitting » par les moindres carrés a été utilisée au long de ce travail, et ce, quelle que soit l'équation utilisée. Les courbes de saturations dans les expériences de binding ont cependant subi un « weighting » de type (1/Y). Cette méthode permet de donner un peu plus d'importance aux points ayant une précision plus grande. Elle s'applique bien quand les points sont obtenus par comptage radioactif (Motulsky and Brown, 2006).

L'équation utilisée pour déterminer les courbes concentration-réponse en électrophysiologie et déduire l'IC<sub>50</sub> et le coefficient de Hill était la suivante (équation 1) :

$$I/I_{cont} = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{1 + 10^{(Log(IC_{50}) - X) * n_h}}$$

**Équation 1 : Equation de Hill à pente variable.**

I :	Courant mesuré
I <sub>cont</sub> :	Courant de départ
Bottom :	Inhibition maximale obtenue
Top :	Valeur de départ
X :	La concentration
n <sub>h</sub> :	Coefficient de Hill

Il s'agit en fait d'une variante de l'équation de Hill classique  $E/E_{max} = [A]/[A] + EC_{50}$ , adaptée pour tenir compte du fait que l'on bloque un courant (I au lieu de E) et que plusieurs ligands SK ne bloquent pas le courant à 100%. L'IC<sub>50</sub> dans notre cas représente donc la concentration de bloqueur qui produit la moitié de son bloc maximal (et non pas la moitié du courant total mesuré).

En binding, l'équation utilisée pour obtenir les courbes de saturation et déduire le  $K_d$  et le coefficient de Hill était la suivante :

$$\text{Specific Binding} = \frac{B_{max} * L^h}{(K_d^h + L^h)}$$

**Équation 2 : Equation de saturation à pente variable.**

$B_{max}$  : Saturation des sites  
 $K_d$  : Coefficient de dissociation  
 $h$  : Coefficient de Hill  
 $L$  : Concentration en ligand

#### 4.6 Statistiques

Le logiciel Prism 5.1<sup>®</sup> (Graphpad Software<sup>®</sup>) a été utilisé pour la réalisation des tests ANOVA et t de Student de ce travail (non-pairés). Les valeurs numériques sont exprimées par les moyennes  $\pm$  erreur standard sur la moyenne.

#### 4.7 Binding et préparation membranaire

La culture et la transfection des cellules ont été effectuées selon la méthode décrite plus haut, sauf que la culture a été réalisée dans des boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre, étant donné la nécessité de transfecter un nombre important de cellules. Les différents tampons utilisés étaient :

- Tampon de lyse: 50 mM Tris + 1% BSA à pH 7,4
- Tampon final : 50 mM Tris + 5 mM KCl à pH 8,5

Le milieu des boîtes est d'abord éliminé et les cellules sont reprises par 5 ml/boîte de PBS froid (sur glace). Les cellules sont ensuite centrifugées pendant 10 minutes à 1000 g à 4 °C et concentrées dans 1ml/boîte de PBS froid avant d'être centrifugées 10 minutes à 1000 g à 4 °C. Le culot est ensuite resuspendu dans le tampon de lyse (1ml/boîte) et placé dans une seringue munie d'une aiguille de 21G. La solution est poussée 20 fois à travers cette dernière pour faciliter la lyse. Cette étape est suivie d'une centrifugation à 200 g durant 10 minutes à 4 °C pour éliminer les noyaux. Le surnageant contenant les membranes est ensuite centrifugé deux fois 20 minutes à 16000 g (1 ml/boîte). Un dosage de protéines par le kit « BCA protein assay kit » de la firme Pierce (Thermo Fisher Scientific) est ensuite effectué. La préparation

membranaire est ensuite conservée dans un congélateur -80 °C après adjonction de glycérol (10%).

Les expériences de binding sont ensuite réalisées selon le protocole décrit précédemment (Graulich et al., 2005).

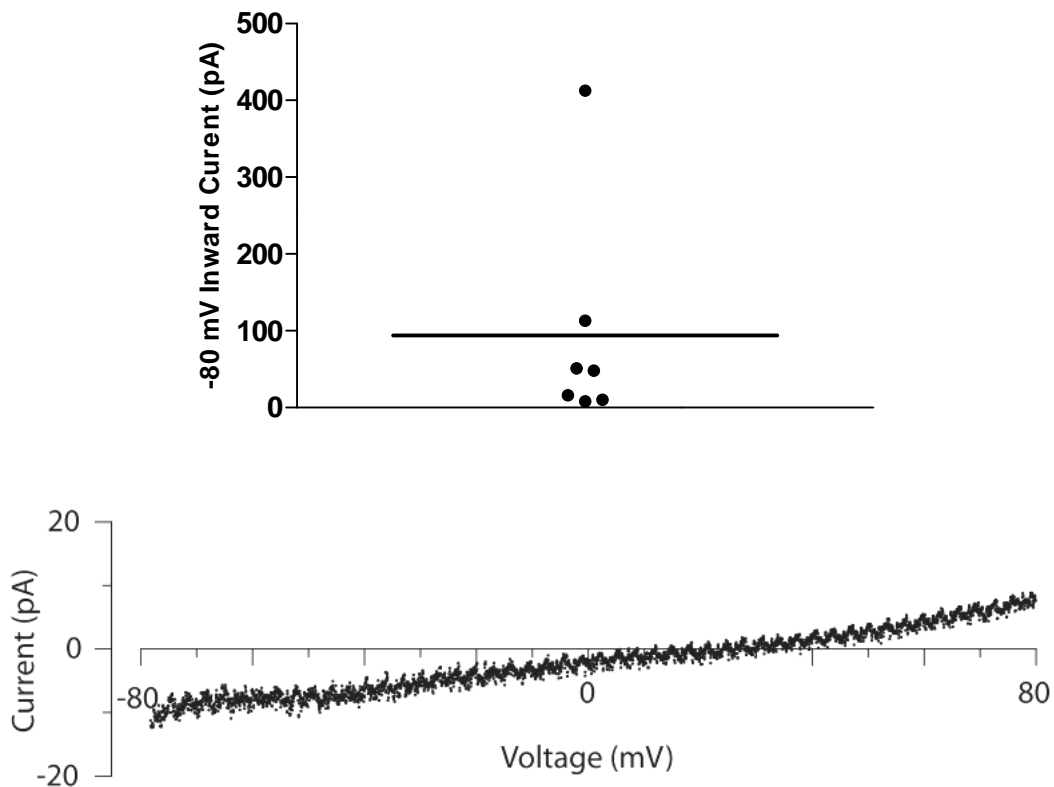
#### 4.8 Les cellules de type HEK293

Les cellules HEK-293 ont été créées dans les années septante. Comme leur nom l'indique, elles sont issues de la transformation par un adénovirus de cultures primaires de cellules épithéliales embryonnaires de rein humain. Le numéro 293 correspond au numéro de l'expérience (Graham et al., 1977). Nous avons choisi ce type cellulaire comme système d'expression. Ce choix se base sur la facilité de culture de ces cellules qui ne nécessitent qu'un entretien de routine et possèdent une vitesse de multiplication élevée souhaitable pour la fabrication de membranes. Les plasmides que nous avons utilisés codent pour des canaux d'origine mammifère, il nous a en effet semblé préférable d'utiliser un système d'expression du même règne plutôt que d'utiliser des ovocytes de *xénope*, pourtant également répandus dans les expériences d'électrophysiologie. Il est néanmoins établi que les propriétés des canaux ioniques peuvent varier en fonction du système d'expression utilisé (Seeböhm et al., 2001). Bien qu'il soit difficile d'évaluer le biais introduit par l'utilisation d'un système hétérologue, nous pouvons cependant vérifier l'absence de courants endogènes dans nos conditions d'enregistrement.

Le même type de lignée a déjà été utilisé pour l'enregistrement de courant SK (Benton et al., 2003) et les contrôles effectués sur cellules non transfectées dans cette étude ne montrent pas de courant SK (cellules maintenues à -80 mV en potassium physiologique suivi d'un protocole de pulses de 100 ms de -120 à +40 mV, par pas de 20 mV). Cependant, plusieurs autres études montrent la présence d'autres canaux susceptibles de générer des courants, tels que des canaux K<sup>+</sup> voltage-dépendants, des canaux sodiques et calciques. La présence de canaux chlorure, hASIC1a et des canaux de type « store-operated » est également décrite (Varghese et al., 2006). La conductance générée par ces canaux semble relativement faible exception faite pour les canaux de type K<sub>v</sub> qui semblent générer des courants sortant relativement important. Une étude montre que des courants de l'ordre du nA peuvent être

mesurés en configuration cellule entière (Varghese et al., 2006). Il était donc important dans notre cas d'examiner cette possibilité.

Des expériences avec des cellules non transfectées montrent en général peu de courant entrant en configuration « whole-cell ». La figure 14 montre les valeurs de courant entrant obtenues lors d'expériences de contrôle et un exemple de trace de courant. A titre de comparaison, les valeurs de courant obtenues dans les cellules transfectées, et dans la même configuration sont de l'ordre de 3 à 10 nA, d'où l'importance marginale des canaux endogènes dans le courant enregistré.



**Figure 14:** Expériences contrôles mesurant la quantité de courant dans des cellules non transfectées (n=7) (en haut) et une trace de courant évoquée par une rampe de voltage linéaire de -80 mV à +80mV (en bas).



## 5 Résultats : Inhibition des canaux SK par les protons

### 5.1 Introduction

L'inhibition des courants potassiques par les protons est un phénomène bien étudié, elle a notamment été caractérisée pour les canaux  $K_v1.5$   $K_v1.2$  (Steidl and Yool, 1999)  $K_v1.4$  (Claydon et al., 2000),  $K_v7.2/7.3$  (Prole et al., 2003),  $Kir2.3$  (Ureche et al., 2008),  $K_{2p}2.1$  (Cohen et al., 2008) et les canaux *shaker-like*  $AKT3$  provenant d'*Arabidopsis* (Geiger et al., 2002). Un résidu histidine est fréquemment impliqué dans l'inhibition du courant macroscopique. Par contre, au niveau moléculaire, différents mécanismes sont décrits. Parmi ceux-ci, nous pouvons citer une réduction de la conductance unitaire pour  $AKT3$  et  $Kir2.3$  (Coulter et al., 1995; Geiger et al., 2002), une modification du « gating » et une augmentation de l'inactivation pour  $K_v1.5$  (Kwan et al., 2006) ou un mélange des deux en ce qui concerne les canaux hétérométriques  $K_v7.2/7.3$  (Prole et al., 2003).

L'histidine possède un cycle imidazole sur sa chaîne latérale dont le pKa est de ~ 6. Ce résidu est le seul acide aminé dont le pKa se situe à proximité du pH physiologique. Il constitue donc un acide aminé idéal pour un phénomène de protonation/déprotonation. Il ne sera pratiquement pas chargé positivement à pH physiologique et le deviendra de plus en plus au fur et à mesure que le pH décroît. Bien entendu, le pKa d'un acide aminé isolé n'est qu'une approximation et on pourrait imaginer qu'il varie au sein d'une protéine en fonction de l'environnement électrostatique.

La proportion des deux espèces à un pH donné peut être calculée par l'équation 3 :

$$pH = pKa + \log \frac{[A^-]}{[AH]}$$

**Équation 3 : Proportion de l'espèce chargée et non-chargée en fonction du pH (une seule fonction ionisable).**

L'alignement des séquences entre  $SK2$  et  $SK3$  dans la région du filtre de sélectivité, donc la région prédite de la bouche externe du pore, montre une homologie très importante entre les deux séquences. Nous avons identifié deux positions pouvant revêtir une certaine importance dans l'investigation de l'effet du pH sur les canaux SK. En effet, nous pouvons

remarquer la présence d'un résidu histidine en position 337 sur SK2 et 491 sur SK3 (figure 15). Au vu de l'implication de ce type de résidu dans l'inhibition d'autres canaux potassiques et de sa localisation prédite, il pourrait être un site d'interaction pour les protons au niveau extracellulaire. Une seconde histidine est également présente en position 522 sur SK3, il n'existe cependant pas d'homologie avec SK2 où la position 368 correspondante est occupée par une asparagine neutre (figure 15). Les effets d'un pH sub-physiologique au niveau intracellulaire ayant déjà été investigués (Peitersen et al., 2006), nous avons tenté de découvrir les effets d'un pH bas au niveau de la partie extracellulaire de SK2 et SK3. L'intérêt de cette investigation est, à la base, l'étude des propriétés biophysiques du canal. Cependant, la présence récurrente d'une ou plusieurs charges positives au sein de la structure des bloqueurs de canaux SK nous a également incité à sonder le canal avec la plus petite charge positive disponible : le proton.



**Figure 15 : Alignement des séquences de SK2 et SK3 dans la région du pore externe avec mise en évidence des résidus histidine.**

## 5.2 Justification du tampon calcique

Le chélateur calcique BAPTA a été, dans les expériences sur les protons, utilisé à la place de l'EGTA pour la solution intracellulaire. Lors d'expériences pilotes, nous avons constaté que l'exposition d'une cellule ou même d'un patch excisé en configuration outside-out à des solutions dont le pH variait provoquait des courants instables. Nous nous sommes interrogés sur l'origine de ce phénomène et sommes arrivés à la conclusion que des protons devaient franchir la membrane et modifier localement la concentration en calcium libre. Nous avons donc utilisé du BAPTA qui est moins sensible au pH que l'EGTA. Il possède également une cinétique de liaison/libération plus élevée (50 à 400 fois) et une meilleure sélectivité (Tsien, 1980). Le BAPTA possède en effet deux groupements benzéniques à la

place d'un lien méthylène entre l'oxygène et l'azote. Cette modification permet d'obtenir des valeurs de pKa se situant entre 5.47 et 6.36 pour les amines tertiaires à la place 8.96 et 9.58 pour l'EGTA (Chang et al., 1991).

### 5.3 Solutions utilisées

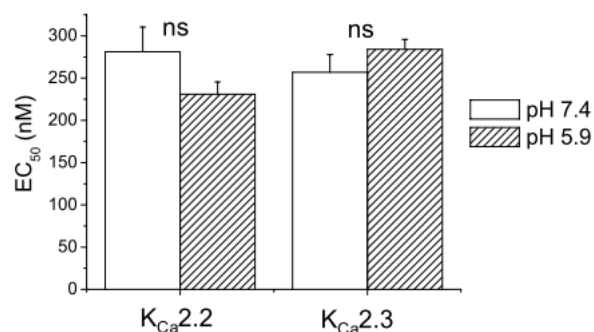
Solution intracellulaire: (mM) : KCl (120), HEPES (10), BAPTA (10), Na<sub>2</sub>ATP (1.5), CaCl<sub>2</sub> (9.65), MgCl<sub>2</sub> (2.34). La solution est amenée au pH de 7.4 par ~ 40 mM KOH et contient 1μM de Ca<sup>2+</sup> libre.

Solution extracellulaire pH 7.4 (mM) : KCl (120), HEPES (10), EGTA (10), CaCl<sub>2</sub> (6.19), MgCl<sub>2</sub> (1.44). La solution est amenée au pH de 7.4 par ~ 40 mM KOH et contient 60 nM de Ca<sup>2+</sup> (libre).

Solution extracellulaire pH 5.5-6.6 (mM): KCl (120), KMES (10), EGTA (10), CaCl<sub>2</sub> (0.02), MgCl<sub>2</sub> (1.03). La solution est amenée au pH de 7 par KOH et contient 60 nM de Ca<sup>2+</sup> (libre).

### 5.4 Expérience contrôle permettant d'exclure une courbe d'activation par le Ca<sup>2+</sup> différente à bas pH

Afin de démontrer que les protons agissent au niveau du pore, nous devons exclure la possibilité d'une modification de la sensibilité du canal aux ions calciques. S. Goodchild (Université de Bristol) a démontré expérimentalement que la courbe d'activation par le Ca<sup>2+</sup> n'était pas modifiée entre le pH 7.4 et 5.9 (figure 16).



**Figure 16 : Le pH extracellulaire ne modifie pas l'activation des canaux SK2 et SK3 via un éventuel déplacement du tampon calcique par infiltration de protons à travers le patch ou un changement structurel entraînant une modification du gating par le calcium.**

## 5.5 Inhibition différentielle des canaux SK2 et SK3 par l'augmentation extracellulaire de $[H^+]$

Les expériences présentées dans cette section ont été effectuées dans la configuration « outside-out » afin de limiter d'éventuelles variations du tampon calcium et donc d'éviter de modifier la conductance SK d'une manière aspécifique par changement de concentration en calcium. Les patchs ont été excisés à pH physiologique puis exposés à différents pH. Cette première expérience a démontré que les canaux SK2 et SK3 étaient tous deux inhibés par des valeurs de pH inférieures à 7.4 (Figure 17).

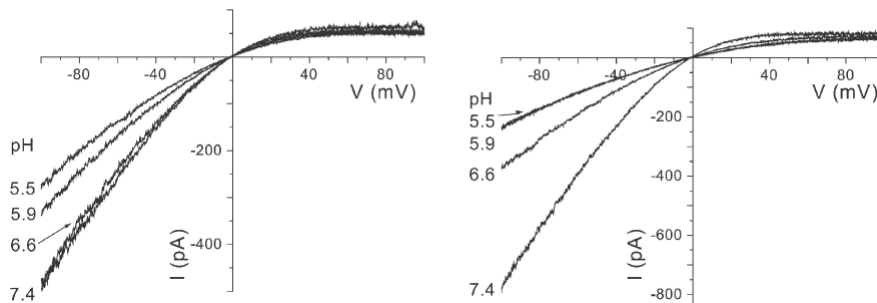


Figure 17 : Courants évoqués par des rampes de voltages de -100 à +100 mV à différents pH (configuration outside-out). SK2 à gauche et SK3 à droite. D'après Goodchild et al., 2009.

Les  $IC_{50}$  obtenues étaient de 630 nM et 158 nM, donnant des valeurs de  $-pIC_{50}$  (et donc les valeurs de pH diminuant de moitié le courant) de  $6.2 \pm 0.027$  et  $6.8 \pm 0.01$  respectivement pour SK2 (n=3) et SK3 (n=4). Le courant SK3 s'est avéré plus sensible à la diminution de pH par rapport à SK2 ( $P < 0.0001$ ) (figure 18).

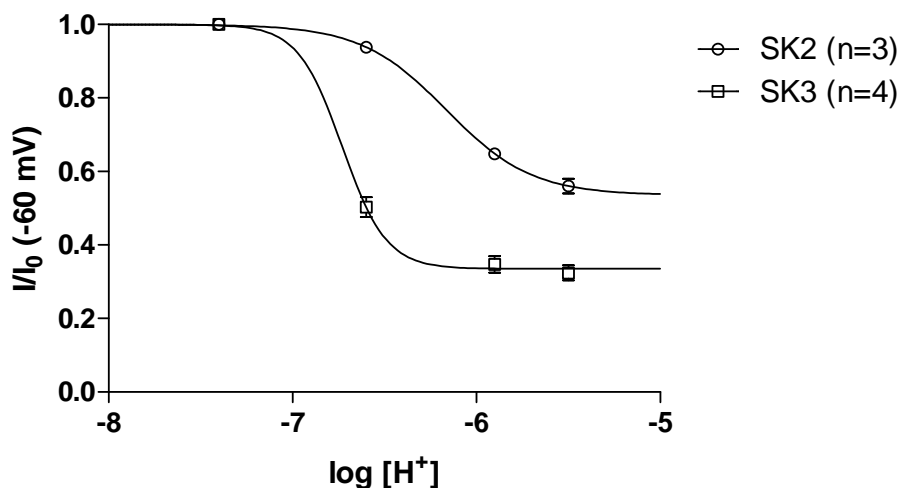
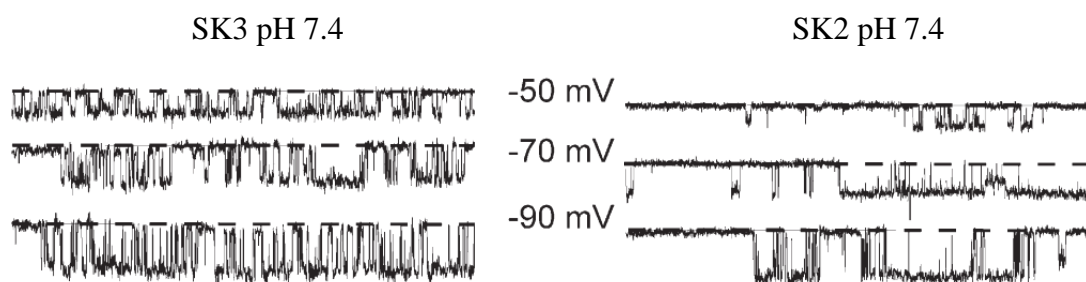


Figure 18 : Courbe concentration-réponse pour  $H^+$  mesurée à -60 mV en configuration « outside-out ».

## 5.6 Mécanisme moléculaire du bloc par les protons

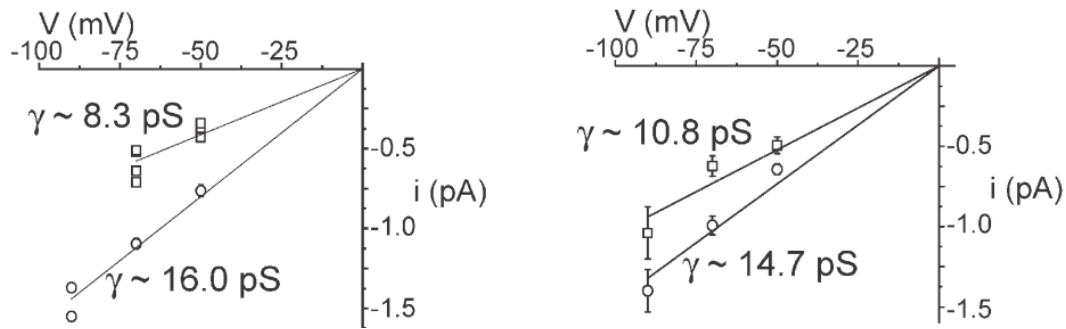
Expériences effectuées par Neil Marrion, Vincent Seutin et Sam Goodchild

L'inhibition des courants par une diminution du pH est un phénomène connu. Dans la littérature différents mécanismes sous-jacents à cette inhibition ont été décrits. Par exemple, pour Kv1.5, la réduction de courant est due à une diminution de la probabilité d'ouverture (Kwan et al., 2006) tandis que pour les canaux potassiques à rectification entrante, il s'agit plutôt d'une réduction de la conductance unitaire (Coulter et al., 1995; Geiger et al., 2002). Afin d'explorer le mécanisme d'action des protons sur les canaux SK, des enregistrements de type « single channel » à différents potentiels ont été réalisés (figure 19).



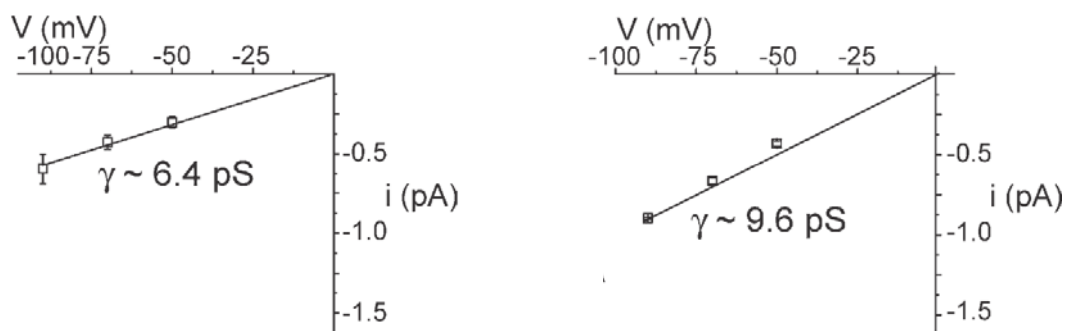
**Figure 19 : Exemples de traces de courant unitaires à différents voltages (configuration inside-out) pour SK2 et SK3. D'après Goodchild et al., 2009.**

Le mécanisme impliqué dans l'inhibition du courant macroscopique est une réduction de la conductance unitaire. En effet, l'analyse de plusieurs minutes d'enregistrements nous a permis d'obtenir les conductances des canaux sauvages à pH 7.4 et en présence de 200 nM de  $\text{Ca}^{2+}$  libre. Les canaux SK2 et SK3 possèdent chacun deux états de conductance de ~15 et 11 pS ( $14.7 \pm 1.1$  et  $10.8 \pm 1.4$  pS,  $n = 3$ ) et ~ 16 et 8 pS ( $15.8 \pm 0.6$  et  $8.3 \pm 0.6$  pS,  $n = 5$ ) respectivement. (figure 20). L'état de conductance le plus élevé est de loin le plus prévalent pour les 2 types de canaux (Goodchild et al., 2009).



**Figure 20 : Analyse des différents états de conductance du canal SK3 (à gauche) et SK2 (à droite) à pH 7.4. D'après Goodchild et al 2009.**

Les expériences réalisées en bas pH, à savoir pH 5.9 pour SK2 et 6.6 pour SK3 (impossible d'aller à des valeurs de pH plus basses pour SK3 car la résolution des ouvertures et fermetures du canal est impossible à un pH inférieur car les évènements ne sont pas suffisamment discriminés du bruit de fond) ont permis de déterminer le mécanisme de blocage des canaux par les protons. Les temps d'ouverture du canal ne sont pas affectés par un pH acide (les détails chiffrés se trouvent dans (Goodchild et al., 2009)). Le paramètre impliqué dans la diminution du courant macroscopique est la conductance unitaire qui se voit fortement réduite. En effet, en condition de bas pH, les deux canaux ne montrent plus qu'un seul état de faible conductance, à savoir 9.6 pS ( $9.6 \pm 0.07$  pS,  $n = 3$ ) pour SK2 et 6.4 pS ( $6.4 \pm 0.8$  pS,  $n = 4$ ) pour SK3 (figure 21).



**Figure 21 : Analyse des différents états de conductance du canal SK3 à pH 6.6 (à gauche) et SK2 à pH 5.9 (à droite) à pH 7.4. D'après Goodchild et al., 2009.**

Le mécanisme de blocage du courant macroscopique pour les canaux SK se traduit donc par une diminution de la conductance unitaire.

## 5.7 Un résidu histidine dans la partie S5-boucle P est crucial pour l'inhibition du courant par les protons

Comme nous l'avons évoqué plus haut, les canaux SK sont rapidement inhibés par une diminution du pH. L'explication la plus simple serait une interaction entre les protons et des acides aminés du pore qui se verraient ionisés. Comme nous l'avons déjà évoqué, l'espèce la plus probable pour ce type d'interaction est le résidu histidine dont le résidu imidazole est faiblement basique ( $pK_a \sim 6$  ; 6.32 selon une simulation à l'aide du logiciel SPARC). Ceci a pour conséquence une faible proportion d'histidine ionisée à pH 7.4 (2 % d'après la simulation) et une augmentation de cette proportion quand le pH diminue (30 % à pH 6 et 41% à pH 5.8). Bien entendu, ces valeurs doivent être adaptées en fonction de l'environnement et ne représentent qu'une vue semi-quantitative.

Nous avons aligné la région formant vraisemblablement la partie S5-boucle P-S6 du pore pour les canaux SK2 et SK3 et un résidu histidine conservé a été identifié sur SK2 en position 337 et SK3 en position 491. Une autre histidine est également présente dans cette partie du pore en position 522 sur SK3, cette position est occupée par une asparagine sur SK2 (figure 22).

La première étape consistant à identifier les sites d'interactions des protons a été le remplacement de l'H522/337 (ionisable par son noyau imidazole sur la chaîne latérale) par une asparagine qui possède un groupement amide neutre (figure 23).

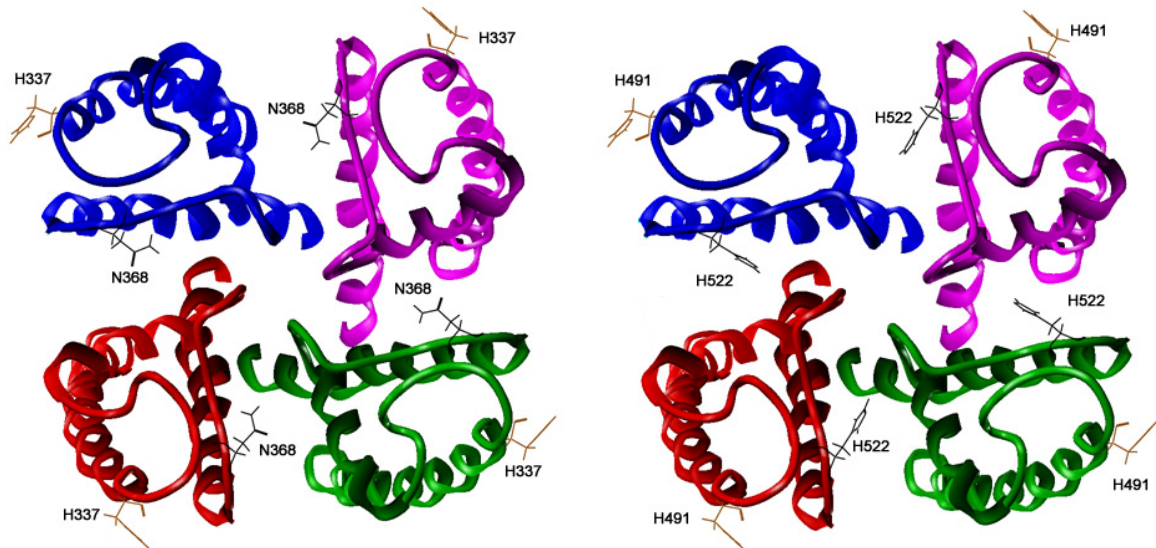
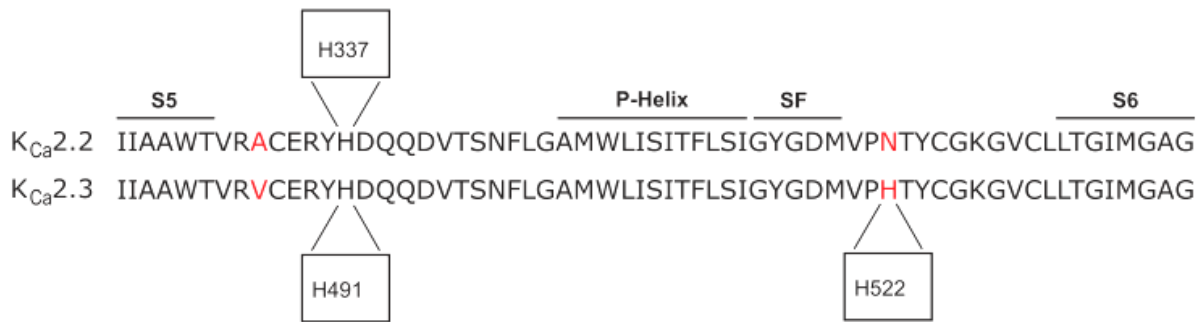


Figure 22 : En haut : alignement des acides aminés de la région externe du pore. En bas : modèle de la partie S5-P-S6 de SK2 (à gauche) et SK3 (à droite) avec les histidines et l'asparagine de SK2 représentés. Adapté d'une image de S. Dilly.

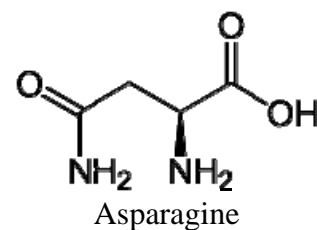
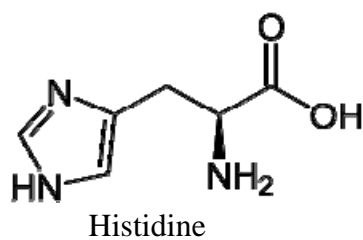


Figure 23 : En haut : alignement des séquences SK2 et SK3 montrant l'emplacement de la mutation. En bas : structure d'une histidine avec son noyau imidazole ionisable et une asparagine avec sa chaîne latérale neutre.



Des expériences de patch-clamp en mode voltage contrôlé et en configuration cellule entière ont donc été réalisées afin de déterminer si la neutralisation de l'histidine permettait de réduire ou d'abolir la sensibilité au pH des canaux SK2 et SK3. Comme le montrent les traces de la figure 24, il s'avère que notre hypothèse était correcte et que ce résidu histidine est effectivement l'acteur principal dans l'effet du pH sur l'inhibition du courant. Aussi bien pour SK2 que pour SK3, le remplacement de l'histidine par une asparagine abolit l'inhibition du courant par les protons jusqu'à un pH de 5.5.

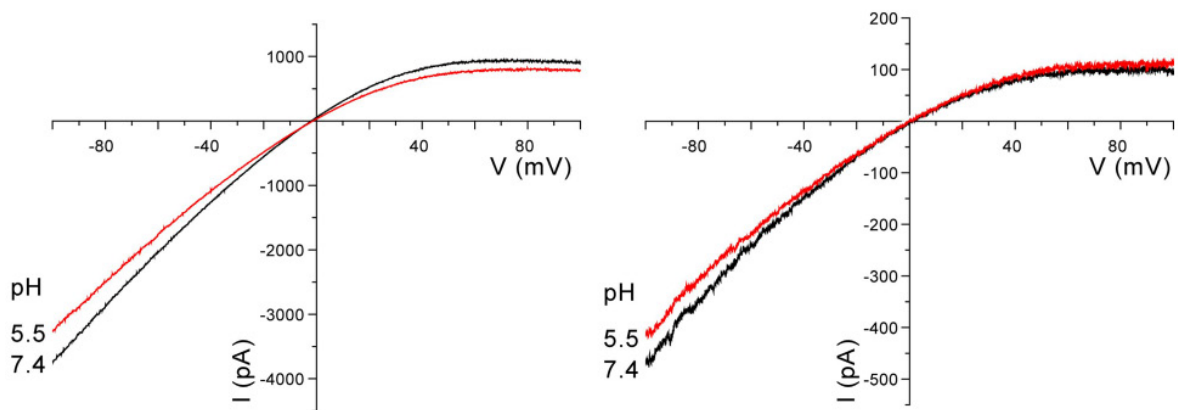


Figure 24 : Traces de courant évoquées par une rampe de voltage linéaire partant de -100 à +100 mV sur les mutants SK2H337N (à gauche) et SK3H491N (à droite). La trace noire est la trace contrôle à pH 7.4 tandis que la rouge représente celle à pH 5.5 (d'après Goodchild et al., 2009).

La courbe concentration-réponse ci-dessous (figure 25) montre clairement qu'une légère inhibition a encore lieu malgré la mutation. Elle est cependant marginale par rapport à ce que l'on observe dans les canaux sauvages.

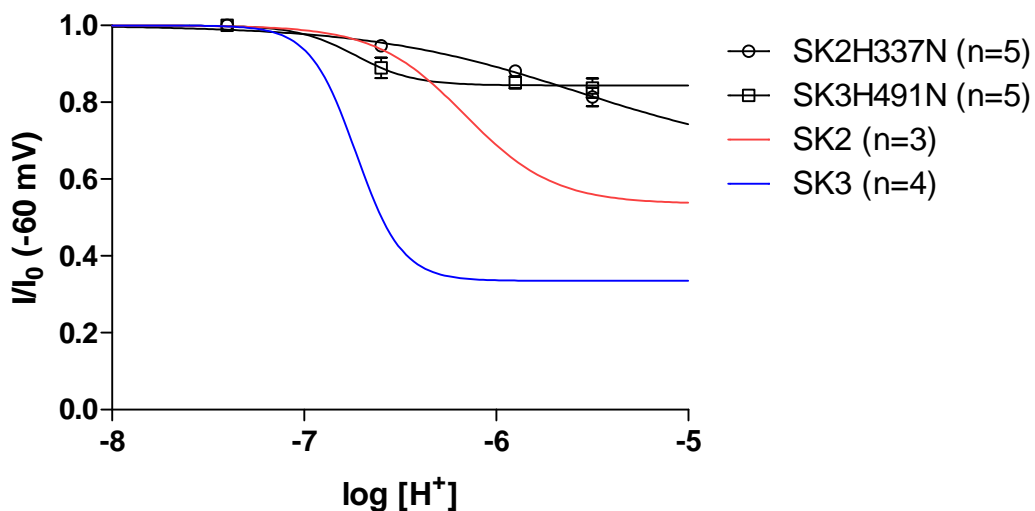


Figure 25 : Effet de la mutation d'une histidine conservée de la région du pore sur la sensibilité aux protons du milieu extracellulaire.

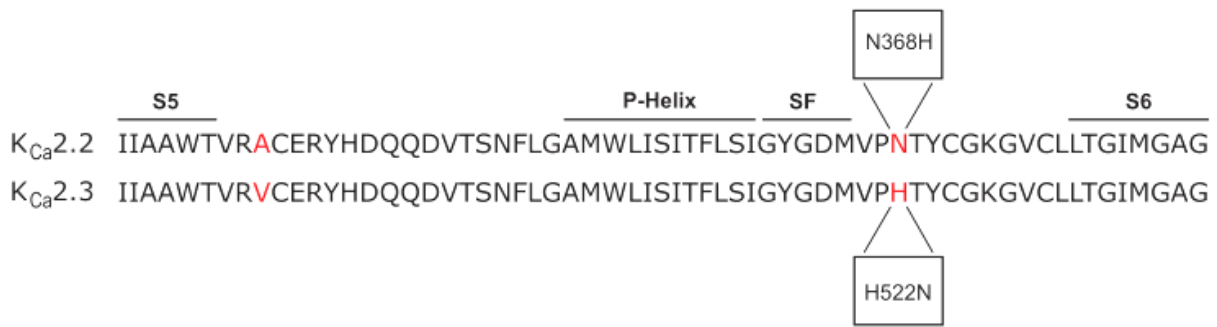
## 5.8 Une histidine supplémentaire sur SK3 est responsable de la plus grande sensibilité du canal à une diminution de pH

Comme nous l'avons évoqué ci-dessus, le sous-type SK3 est plus sensible à la baisse de pH. L'alignement des séquences nous montre que ce dernier possède une histidine supplémentaire (H522) que notre modèle tridimensionnel situe près de la bouche du pore (figure 26).



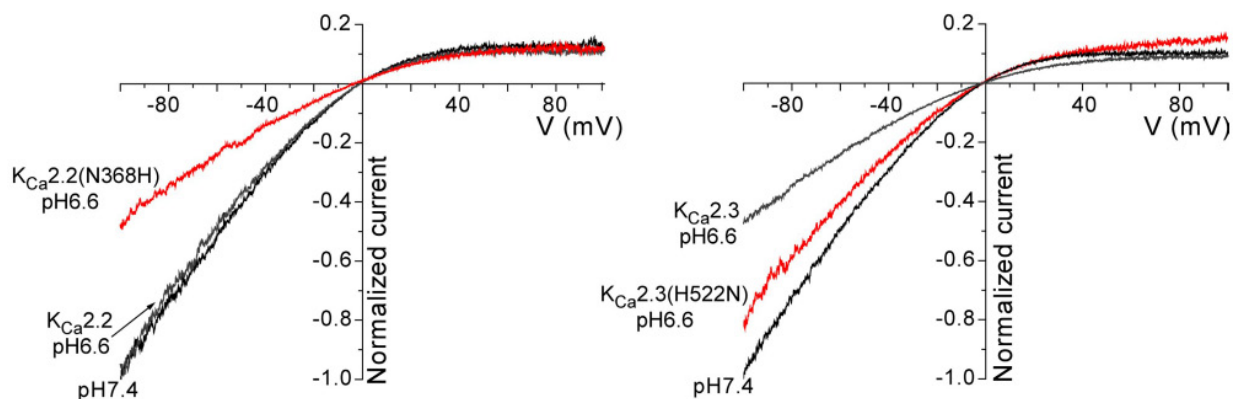
**Figure 26 : Le sous-type SK3 possède une histidine (en rouge) de plus dans la région du pore par rapport à SK2.**

Afin de déterminer si cette histidine supplémentaire portée par SK3 était responsable de sa plus grande sensibilité au pH, nous avons créé deux mutants permettant d'explorer cette hypothèse. Le premier consiste à transformer cette histidine supplémentaire (H522) en une asparagine neutre sur un canal SK3 sauvage rendant cette position identique à celle de SK2. Le second mutant consiste à muter dans la séquence de SK2 la position correspondante, à savoir, une asparagine (N368) en une histidine. En résumé, nous avons transformé cette région afin que le canal SK2 ressemble à SK3 et vice et versa (figure 27).



**Figure 27 : Alignement des séquences de SK2 et SK3 avec les mutations réalisées.**

Les résultats obtenus lors des expériences sur les mutants vont dans le sens attendu. En effet, la mutation de l'asparagine 368 en histidine sur SK2 permet d'augmenter la sensibilité du canal par rapport à une baisse de pH. La situation inverse, à savoir l'échange de l'histidine 522 par une asparagine sur le sous-type SK3 a permis de réduire l'effet du pH sur ce dernier. Les traces de courants normalisés de la figure 28 illustrent nos résultats. Nous pouvons y voir que le sous-type SK2 sauvage insensible au pH6.6 le devient suite à la mutation et, inversement, le sous type SK3 devient moins sensible à ce même pH suite à la permutation de l'histidine en asparagine.



**Figure 28 : L'histidine supplémentaire du sous-type SK3 est responsable de sa plus grande sensibilité (d'après Goodchild et al., 2009).**

D'un point de vue quantitatif, la mutation N368H au niveau du canal SK2 donne une courbe concentration réponse quasi identique à celle obtenue pour le canal SK3 sauvage ( $P=0.91$ ) avec une  $IC_{50}$  de  $160 \pm 33$  nM correspondant donc à une valeur de pH égale à 6.8. Le mutant SK3 voit sa sensibilité diminuer d'une façon significative par rapport au type sauvage ( $p < 0.0001$ ) avec une  $IC_{50}$  de  $688 \pm 28$  nM correspondant à un pH de demi-inhibition

de 6.4, qui est donc inférieur à la valeur moyenne de 6.8 pour le sous-type sauvage (figure 29).

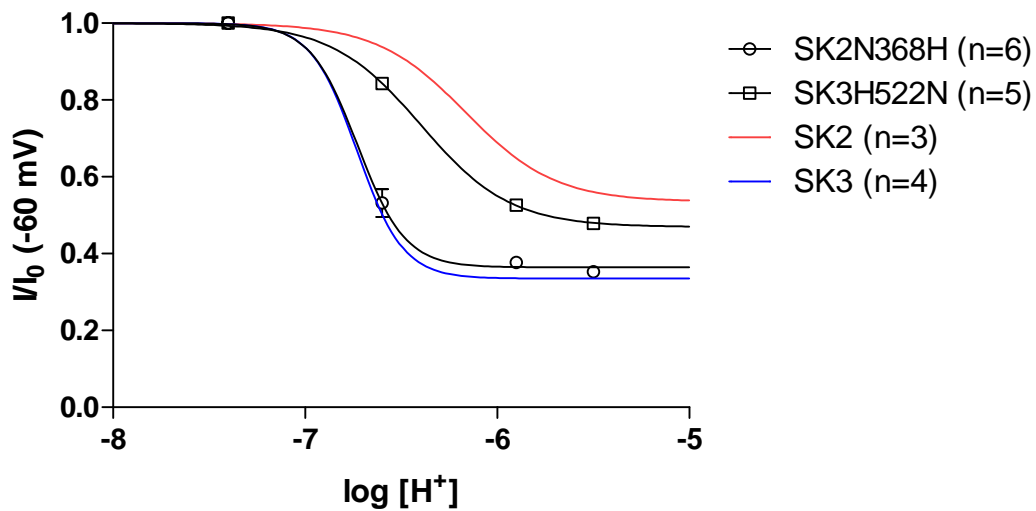


Figure 29 : Courbe concentration-réponse de H<sup>+</sup> sur les mutants KCa2.2(N368H) et KCa2.3(H522N) par rapport aux canaux sauvages.

### 5.9 L'histidine commune reste le contributeur principal de l'inhibition par un bas pH

La mutation H337 sur le sous-type SK2 entraîne une absence d'histidine entre S5 et S6. Nous avons montré précédemment que cette mutation réduisait drastiquement l'effet de la diminution de pH sur le canal. Le mutant SK3 correspondant H491N possède encore cependant une histidine supplémentaire. Afin de réaliser un dernier contrôle, nous avons réalisé une double mutation sur le canal SK3, à savoir H491N et H522N pour éliminer toute présence d'histidine entre S5 et S6 (figure 30).

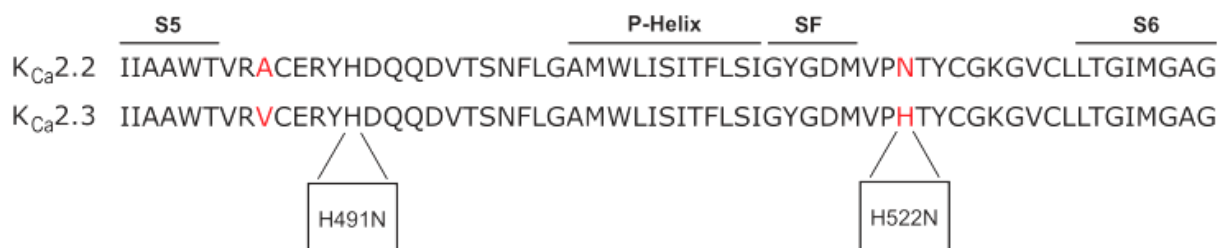


Figure 30 : Alignement montrant la double mutation réalisée au niveau de la séquence SK3.

Comme attendu, la double mutation n'a pas que peu d'impact, comme l'attestent les courbes concentration-réponse de la figure 31.

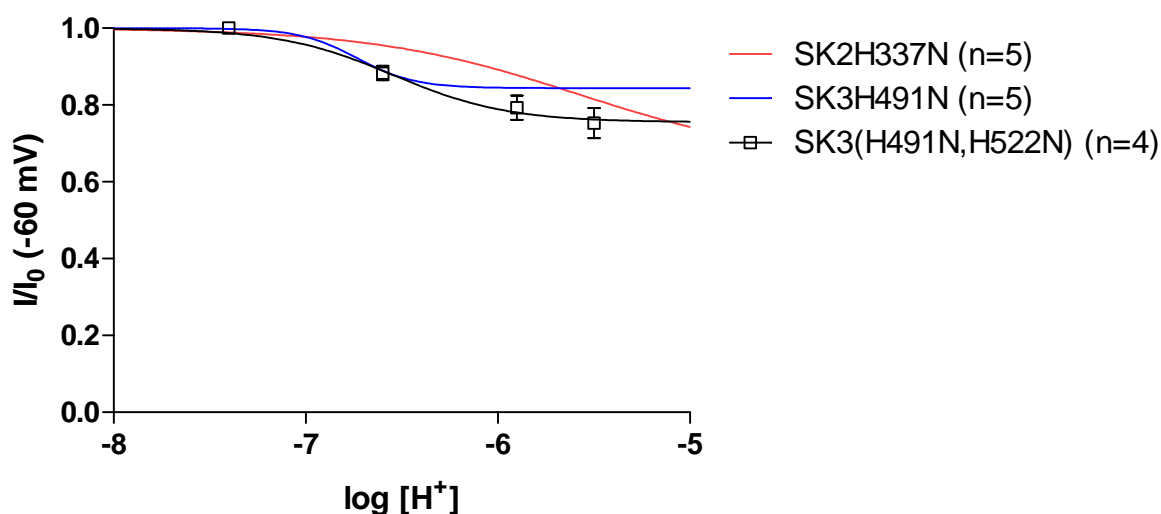


Figure 31 : Effet de la double mutation sur le sous-type SK3.

Le mutant SK2(H337N) a également été testé en « single channel ». On constate que le remplacement de l'histidine par une asparagine entraîne une chute de la conductance unitaire ainsi que la perte de deux états de conductance. Ce phénomène enregistré à pH 7.4 est semblable à celui observé pour le canal sauvage à bas pH (figure 32). L'hypothèse d'une telle observation serait que la protonation de l'histidine entraîne la rupture d'une liaison intramoléculaire et une modification allostérique diminuant l'efficacité du canal. La mutation de l'histidine induirait *de facto* l'absence de cette liaison.

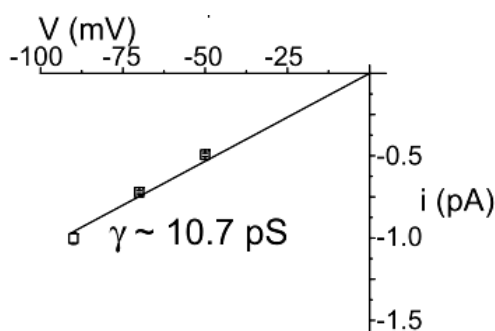


Figure 32 : Conductance du canal SK2H337N, les conductances du canal sauvage sont illustrées figure 21. D'après Goodchild et al., 2009.

## 5.10 Discussion

A l'instar d'autres canaux potassiques, les canaux SK sont inhibés par un pH acide. Le site d'interaction principal entre les protons et les canaux a été identifié (SK2H337/SK3H491) par mutagenèse dirigée. Nous avons, de plus, montré que les canaux SK3 étaient plus sensibles que les SK2 avec des  $IC_{50}$  correspondant à des valeurs de pH de ~6.8 et ~6.2 respectivement. Cette observation nous a menés à l'identification d'un site d'interaction secondaire sur SK3 (SK3H522), qui confère à ce sous-type une sensibilité supérieure.

Appréhender les changements structuraux créés par une simple protonation n'est pas chose aisée. En effet, nous pouvions imaginer qu'il ne s'agissait que de l'ajout d'une charge positive à un endroit précis avec une influence très localisée mais également que des interactions avec d'autres acides aminés pouvaient être créées ou rompues amenant à un changement structural important. Nous devons donc vérifier que l'exposition des canaux à un bas pH extracellulaire n'allait pas entraîner un changement structural modifiant la courbe d'activation des canaux par les ions calciques. Nous n'avons pas observé de tel changement et nous pouvons donc conclure que les inhibitions observées ne proviennent pas d'une modification de la courbe d'activation par le calcium et que le mécanisme d'activation du canal est probablement conservé.

Des expériences en « single channel » ont permis d'élucider comment le courant macroscopique était réduit. Les canaux SK2 et SK3 montrent deux états de conductances (~16.0 et ~8.3 pS pour SK3 et ~14.7 et ~10.8 pS pour SK2). Lors de l'exposition à un bas pH, nous n'avons plus observé qu'une seule conductance de faible amplitude de ~6.4 pS pour SK3 (à pH 6.6) et ~9.6pS (à pH 5.9). Il n'a pas été possible d'enregistrer les canaux SK3 à pH 5.9 car la conductance unitaire était tellement faible que les évènements d'ouverture/fermeture étaient noyés dans le bruit. Il est intéressant de constater que les enregistrements en canal-unitaire sont le reflet de ce que nous avons observé en courant macroscopique, à savoir une plus grande sensibilité aux protons de SK3 par rapport à SK2.

Nous avons donc identifié la localisation de sites d'interactions des protons avec les canaux SK et suggéré le mécanisme moléculaire de leur bloc. Le lien entre la protonation de la (des) histidine(s) et la réduction de conductance reste à découvrir

Bien que nous ayons en partie exclu une modification importante au niveau du mécanisme du « gating » en montrant que la courbe d'activation par le calcium était identique au pH extracellulaire de 7.4 ou 5.8, il n'est pas impossible que la protonation de l'histidine entraîne la rupture d'une interaction locale de celle-ci avec un autre acide aminé. Ceci entraînerait une perturbation locale de la forme du pore et un ralentissement du flux potassique. Cette hypothèse est la plus plausible et est étayée par le fait que le mutant SK2(H337N) montre une conductance altérée à l'instar de son homologue sauvage à pH5.9.

Une autre hypothèse envisageable serait que cette histidine fasse partie du chemin emprunté par les ions potassiques. Il y aurait dès lors une compétition entre les  $K^+$  et les protons. Ce mécanisme est moins probable pour deux raisons. La première est que, d'après notre modèle, l'histidine 337 ou 491 se situe relativement loin de la bouche du pore, il serait difficile de concevoir que le chemin des ions potassiques s'étende jusque là. La seconde raison nous est donnée par une expérience de S. Goodchild qui démontre qu'une baisse de la concentration en potassium externe entraîne une diminution de la sensibilité au pH. Or, si le potassium et les protons étaient effectivement en compétition pour un site, une diminution de la concentration en potassium devrait augmenter la sensibilité aux protons comme observé pour les canaux  $K_V1.5$  (Fedida et al., 2005; Kehl et al., 2002).

En conclusion, la protonation de l'histidine (SK2337 ou SK3491) entraîne vraisemblablement une modification allostérique de la partie externe du pore qui ne peut plus, dès lors, conduire efficacement les ions potassiques malgré la liaison du  $Ca^{2+}$ .

L'explication de la plus grande sensibilité de SK3 est beaucoup plus spéculative car le mutant SK3H522N n'a pas été testé avec la technique du canal unitaire. Cependant, nous n'avons pas remarqué une différence de conduction entre SK2 et SK3. Or le mutant SK3H522N imite SK2 pour cette position. Dès lors, il devient plus difficile d'envisager que cette histidine interagisse avec un autre acide aminé et que sa protonation entraîne un changement de structure comme envisagé pour l'histidine commune. D'après notre modèle, étant donné la proximité de cette position par rapport à la bouche externe du pore, l'hypothèse la plus vraisemblable pour expliquer la plus grande sensibilité de SK3 serait que la présence de charges positives induites par la protonation de l'histidine créerait un champ électrique capable de ralentir le flux potassique.

## 6 Résultats : Mécanisme du blocage par l'apamine

### 6.1 Introduction

L'apamine que l'on retrouve dans le venin d'abeille (*Apis mellifera*) est le peptide le plus toxique de ce venin envers les mammifères (Habermann and Reiz, 1965; Labbe-Jullie et al., 1991). Les premières recherches concernant la cible de l'apamine ont été réalisées grâce au développement d'un dérivé marqué à l'iode 125 (Hugues et al., 1982a). Des études sur différents tissus ont, par exemple, montré la présence de récepteurs dans des synaptosomes de cerveau et dans le cœur de rats (Hugues et al., 1982a; Marqueze et al., 1987), au niveau du colon et du foie de cochons d'Inde (Hugues et al., 1982b; Marqueze et al., 1987). Comme nous l'avons vu, l'apamine est un outil pharmacologique très important car elle est hautement sélective pour les canaux SK. En effet, après le clonage de ces derniers (Kohler et al., 1996), il a été possible de déterminer l'effet de différents bloqueurs dirigés vers un des trois sous-types (pour revue, voir (Pedarzani and Stocker, 2008)). Nos travaux sur l'effet du pH sur les canaux SK nous ont permis d'identifier des sites d'interactions de charges positives. A ce jour, tous les bloqueurs SK possèdent au moins une charge positive. Certains bloqueurs ne possèdent pas une charge permanente, mais ont une fonction d'amine tertiaire ionisable (Graulich et al., 2008). Comme évoqué précédemment, il n'existe pas de molécule issue de la chimie organique ayant une sélectivité pour un des sous-types SK, seuls quelques peptides ont un certain degré de sélectivité envers SK2 (voir introduction). Les canaux SK sont présents dans beaucoup de tissus et sont également impliqués dans des processus physiologiques importants (ex : LTP), cependant, l'évaluation des canaux SK comme cible thérapeutique ne peut être réalisée que si des molécules sélectives pour un des sous-types sont créées. L'apamine représente un bon outil d'investigation pour deux raisons. La première est que son  $IC_{50}$  est inférieure d'un facteur  $\sim 40$  pour SK2 par rapport à SK3 et la seconde est d'ordre purement pratique car l'apamine est disponible commercialement, ce qui n'était pas le cas des autres peptides plus sélectifs cités au début de ce travail à l'exception de la tamapine. Le but de ces nouvelles expériences était donc d'investiguer le mécanisme de blocage de l'apamine. Les sites d'interactions identifiés ont ensuite servi de base à des études de « docking » et ont permis d'imaginer des molécules potentiellement sélectives (modélisation et « design » de molécules réalisés par Sébastien Dilly). A l'heure actuelle, ces molécules ne sont pas encore synthétisées et testées dans nos modèles biologiques.



## 6.2 Méthodes : solutions utilisées

Les méthodes générales ont été conservées, la composition des solutions utilisées est présentée ci-dessous:

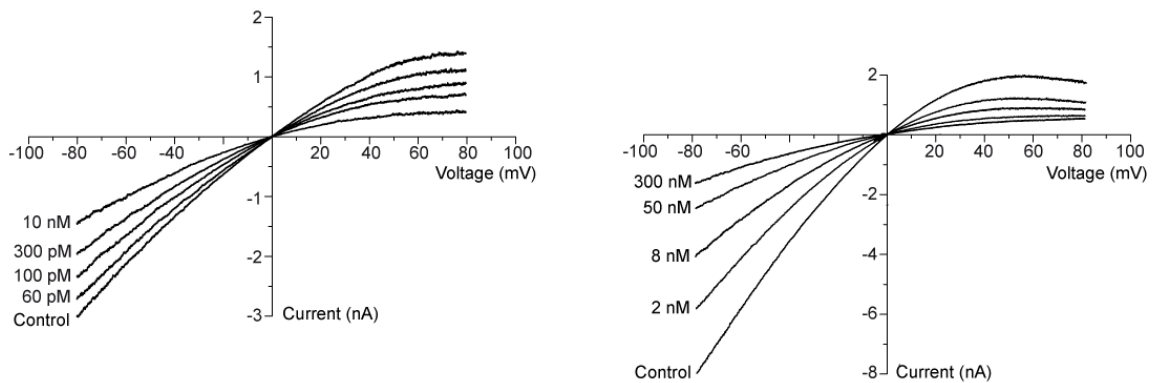
Solution intracellulaire (mM) : KCl (120), HEPES (10), EGTA (10), Na<sub>2</sub>ATP (1.5), CaCl<sub>2</sub> (9.65), MgCl<sub>2</sub> (2.34). La solution est amenée au pH de 7.4 par ~ 40 mM KOH et contient 1μM de Ca<sup>2+</sup> (libre).

Solution extracellulaire symétrique pH 7.4 (mM) : KCl (120), HEPES (10), EGTA (10), CaCl<sub>2</sub> (6.19), MgCl<sub>2</sub> (1.44). La solution est amenée au pH de 7.4 par ~ 40 mM KOH et contient 60 nM de Ca<sup>2+</sup> (libre).

Solution extracellulaire physiologique pH 7.4 (mM) : NaCl (120), KCl (5), HEPES (10), CaCl<sub>2</sub> (2.5), MgCl<sub>2</sub> (1.2), D-glucose (10). La solution est amenée au pH de 7.4 par NaOH.

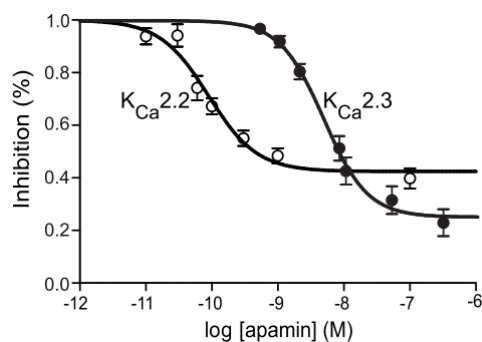
### 6.3 Inhibition différentielle des sous-types de canaux SK par l'apamine

L'apamine inhibe les courants passant par les canaux SK2 et SK3. La figure 33 montre deux expériences réalisées en configuration cellule entière. Chaque trace de courant est évoquée à l'aide d'une rampe de voltage (durée : 1 sec) allant de -80 à +80 mV. L'apamine est ensuite appliquée à des concentrations croissantes. Les temps d'applications et la succession des rampes sont programmés dans un protocole qui rend l'acquisition des données parfaitement standardisée. Il est à noter que l'apamine ne bloque pas tout le courant, même à concentrations supramaximales. L'amplitude du courant non-bloqué est largement supérieure au courant mesuré dans les cellules non-transfectées. Ce phénomène a déjà été décrit pour ces canaux (Dale et al., 2002).



**Figure 33 : Traces types de courants évoqués par des rampes de voltages partant de -80 à +80 mV et application de concentrations croissantes d'apamine pour SK2 (à gauche) et SK3 (à droite).**

L'analyse des résultats obtenus donne des valeurs d' $IC_{50}$  de  $107 \pm 31$  pM et de  $6.1 \pm 1.6$  nM ainsi que des coefficients de Hill de  $1.84 \pm 0.4$  et de  $1.39 \pm 0.11$  pour SK2 ( $n = 10$ ) et SK3 ( $n = 12$ ) respectivement (figure 34).

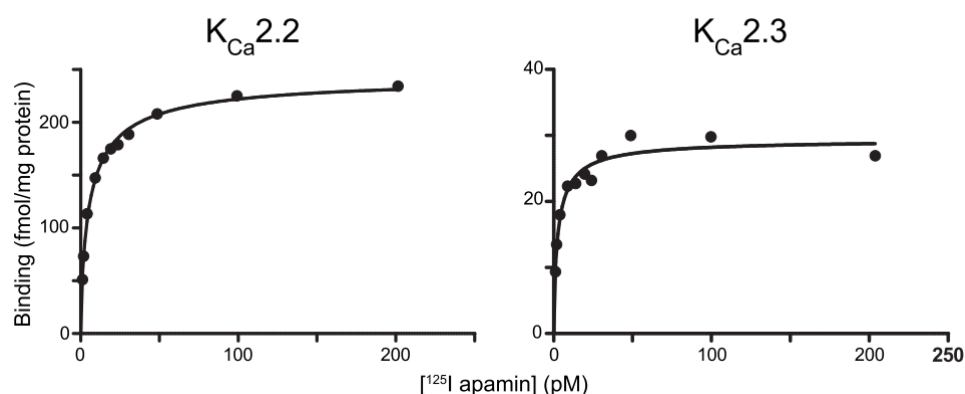


**Figure 34 : « Curve fitting » des données expérimentales selon l'équation de Hill à pente variable.**

Les coefficients de Hill obtenus ont été comparés à la valeur théorique de 1 (qui correspond à une coopérativité nulle). Le résultat de cette analyse montre que la pente de la courbe concentration-réponse de SK3 montre un coefficient de Hill supérieur à l'unité ( $P = 0.005$ ) tandis que nous ne pouvons que constater une tendance pour SK2 ( $P=0.078$ ), peut-être en raison de la variabilité plus grande des résultats. Ces données suggèrent qu'une coopérativité dans le cadre du mécanisme de blocage du courant pourrait exister. Nous avons également réalisé des expériences en  $K^+$  physiologique (le KCl étant remplacé par du NaCl, pour une concentration finale de 5 mM de KCl) afin de vérifier que la concentration externe en potassium n'influçait pas le blocage par l'apamine. Les  $IC_{50}$  et coefficients de Hill obtenus sont égales à  $70 \pm 30$  pM, avec un  $n_h = 0.91 \pm 0.2$  ( $n = 5$ ) pour SK2 et  $2.6 \pm 0.4$  nM avec un  $n_h = 1.2 \pm 0.1$  ( $n = 9$ ) pour SK3. Les valeurs d' $IC_{50}$  ne sont pas différentes par rapport à celles obtenues en  $K^+$  symétrique ( $P=0.16$  pour SK2 et  $P=0.25$  pour SK3).

#### 6.4 L'apamine se fixe avec une haute affinité aux canaux homomériques SK2 et SK3

Des expériences de saturation à l'aide d'  $[^{125}I]$ -apamine ont également été réalisées. Les valeurs de  $K_d$  obtenues sont de  $7.5 \pm 2.3$  et  $8.4 \pm 1.7$  pM pour SK2 et SK3 respectivement ( $n=7$ ), la figure 35 montre une expérience pour SK2 et SK3. Un test t de Student pour valeurs non appariées donne un  $P=0.77$ , il n'y a donc pas de différence entre les deux  $K_d$ . La différence de puissance de l'apamine entre SK2 et SK3 dans les essais fonctionnels ne semble pas être liée à une différence d'affinité étant donné que celle-ci s'avère être identique pour SK2 et SK3.

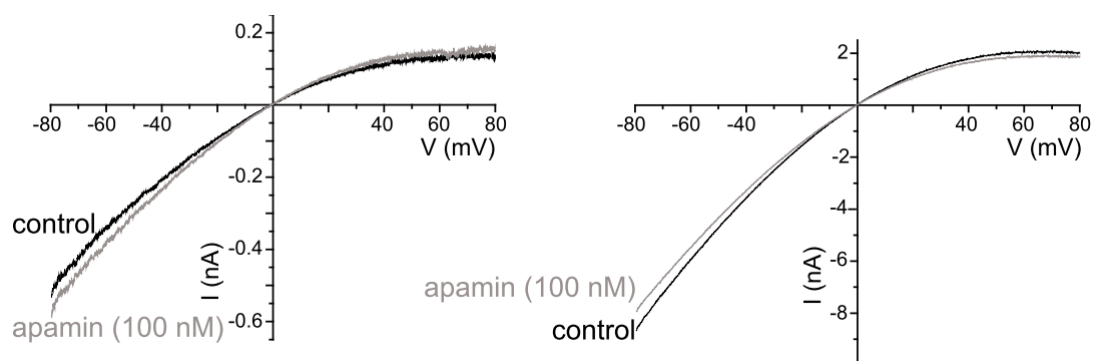


**Figure 35 : Exemples de courbes de saturation pour SK2 (à gauche) et SK3 (à droite).**

Une telle expérience permet également de déduire la valeur du coefficient de Hill, les valeurs obtenues sont de  $0.87 \pm 0.03$  et de  $0.80 \pm 0.1$  (pas de différence significative,  $P=0.49$ ) pour SK2 et SK3 respectivement indiquant que le binding de l'apamine n'est pas coopératif.

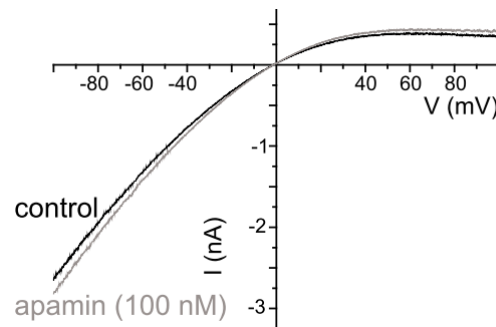
### 6.5 Un résidu histidine au niveau de la tourelle externe du pore est crucial pour le blocage du courant par l'apamine

Nous avons démontré que les protons pouvaient interagir avec des résidus histidine des canaux SK2 et SK3. Un site d'interaction majeur a d'ailleurs été identifié pour les deux sous-types. Etant donné que les bloqueurs de courant SK portent quasi tous au moins une charge positive permanente, nous avons émis l'hypothèse que ce site d'interaction propre aux protons pourrait l'être également pour des bloqueurs. Nous avons donc testé les canaux où nous avons muté ce résidu histidine en une asparagine. Il s'agit des mutants SK2H337N et SK3H491N. Ces deux canaux modifiés ont été testés en  $K^+$  symétrique en configuration cellule entière. L'allure du courant présente une rectification entrante typique du courant SK. La mutation abolit complètement l'effet d'une concentration supramaximale d'apamine. La figure 36 nous montre une trace contrôle (en noir) ayant l'allure d'un courant SK classique et la trace enregistrée en présence de 100 nM d'apamine (en gris) montre l'absence d'effet de la toxine aussi bien sur SK2H337N ( $p=0.22$ ) que sur SK3H491N ( $P=0.11$ ) ( $n=5$ ).



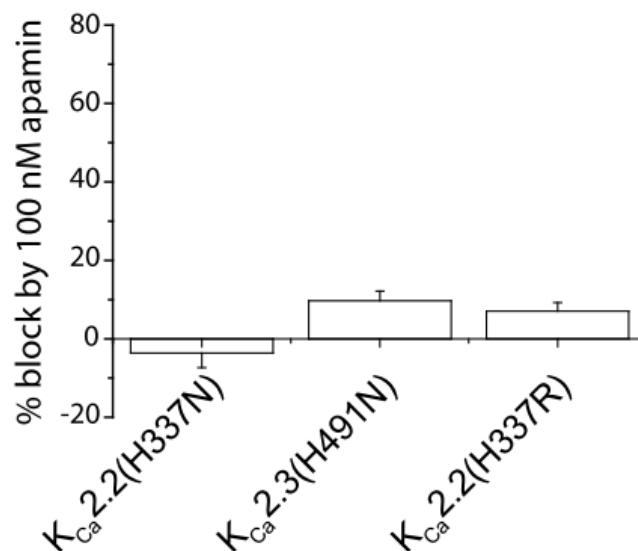
**Figure 36 : Traces de courants évoqués par une rampe de -80 à +80mV montrant l'effet de la mutation d'une histidine conservée. SK2H337 (à gauche) et SK3H491N (à droite).**

Afin de déterminer si la perte du blocage par l'apamine n'était pas liée directement à l'asparagine elle-même, un mutant arginine a également été réalisé avec SK2 à cette position créant ainsi le mutant SK2H337R qui est sous sa forme protonée à pH 7.4. Ce canal est fonctionnel et produit un courant caractérisé par une rectification entrante et reste également insensible ( $P=0.43$ ,  $N=3$ ) à une concentration supramaximale d'apamine (100 nM) (figure 37).



**Figure 37 :** Traces de courants évoqués par une rampe de -100 à + 100 mV avec une trace contrôle en noir et une trace en présence de 100 nM d'apamine en gris sur le mutant SK2H337R. Il n'y a pas de différence de courant détectée lors de l'ajout de l'apamine ( $P=0.43$ ) ( $n=3$ ).

La réalisation de ces deux types de mutants nous permet donc de conclure que le blocage du courant dépend des caractéristiques électrostatiques d'un résidu histidine non ionisé dans cette région du pore. L'histogramme ci-dessous nous montre un résumé de ces expériences (figure 38).



**Figure 38 :** Histogramme résumant la proportion de courant bloqué pour trois mutants insensibles à l'apamine.

Des expériences de « binding » ont également été réalisées sur les mutants SK2H337N et SK3H491N (figure 39). Nous n'avons pas pu mettre en évidence de binding spécifique (n=3), ce qui indique que l'histidine est un site majeur d'interaction avec l'apamine et que celle-ci doit interagir avec ce résidu pour se fixer au canal.

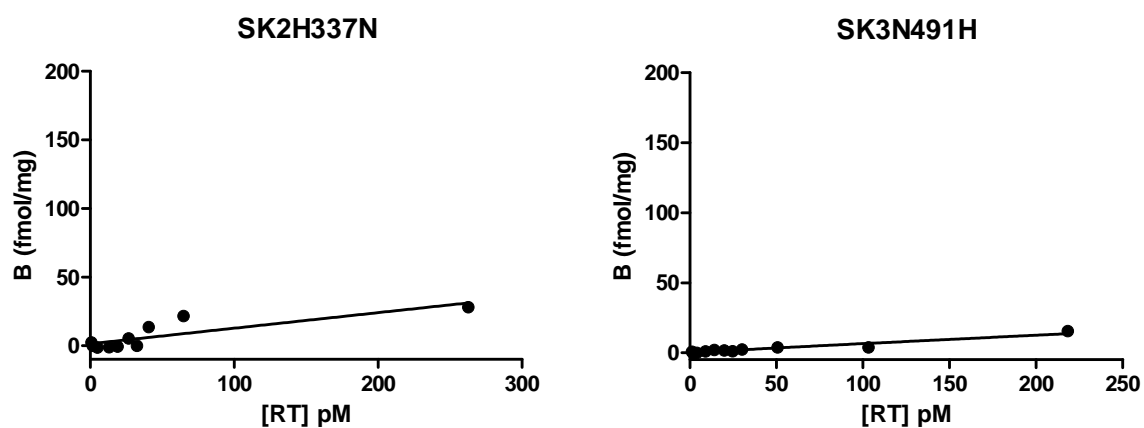
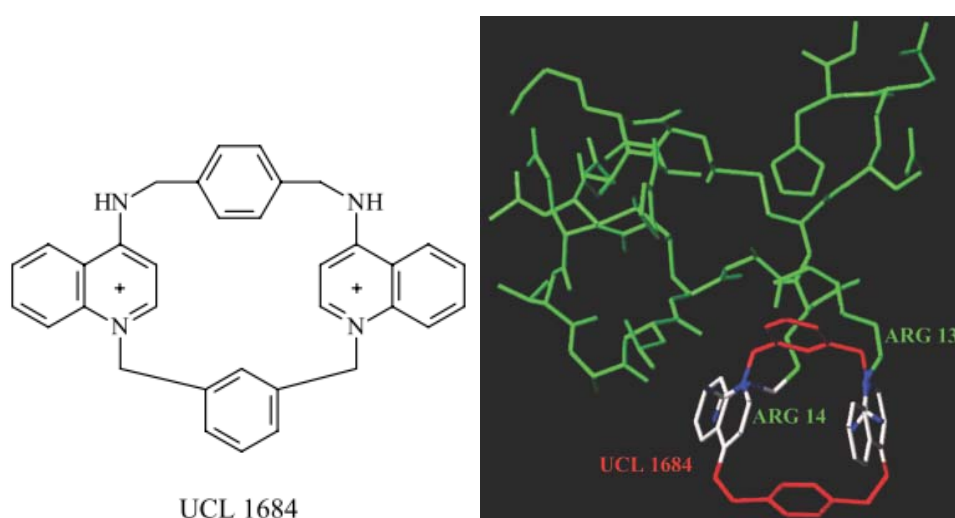


Figure 39 : Expériences de binding sur les mutants insensibles à l'apamine : SK2H337N (à gauche) et SK3H491N (à droite).

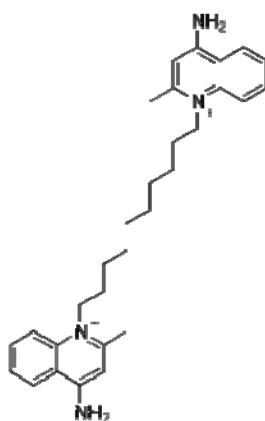
## 6.6 Le résidu histidine contribue également au blocage par d'autres molécules

Les caractéristiques structurales de l'apamine ont été utilisées afin de créer des molécules organiques apparentées (Sorensen et al., 2008a). Dans la famille des cyclophanes bis-quinolinium, l'UCL1684 est particulièrement intéressant car sa structure est telle que les deux charges positives permanentes de la molécule sont espacées de façon analogue aux deux résidus arginines (guanidium) décrits comme étant en partie responsable de l'activité de l'apamine. Une superposition *in silico* de l'UCL 1684 et de l'apamine permet également d'étayer cette hypothèse (Dilly et al., 2005) (figure 40).



**Figure 40 : Molécule d'UCL 1684 à gauche et superposition de cette molécule avec l'apamine. D'après Dilly et al., 2005.**

De plus, une étude comparant l'efficacité d'analogues du dequalinium (figure 41) nous indique que la longueur de la chaîne carbonée entre les deux noyaux quinoliniums est un facteur critique pour l'efficacité de ces composés (Galanakis et al., 1996).



**Figure 41 : Structure chimique du dequalinium.**

La *d*-tubocurarine (figure 42) possède également deux charges positives (une permanente due à la présence d'un azote quaternaire et une autre variant en fonction du pH).

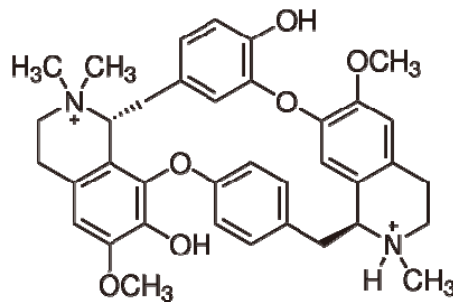


Figure 42 : Structure chimique de la *d*-tubocurarine.

Il était donc possible que la mutation de l'histidine commune entre SK2 et SK3 affecte également la capacité de ces ligands à bloquer le courant. Cette hypothèse peut-être appuyée par le fait que la *d*-tubocurarine (Cook and Haylett, 1985), la N-méthyl-laundosine (NML) (Scuvee-Moreau et al., 2002) et l'UCL1684 (Strobaek et al., 2000) peuvent déplacer l' [<sup>125</sup>I]-apamine. Nous avons donc testé en « patch-clamp » l'UCL1684 (IC<sub>50</sub> = 360 pM (Strobaek et al., 2000)), la *d*-tubocurarine (IC<sub>50</sub> maximum décrite = 17 μM (Strobaek et al., 2000)) ainsi que la NML (IC<sub>50</sub> = 0.8 μM (Scuvee-Moreau et al., 2002)) sur le mutant SK2H337N. Comme la figure 43 le montre, le mutant est également insensible à une concentration supramaximale de ces trois bloqueurs SK. En effet, L'UCL1684 (n=3), la *d*-tubocurarine (n=4) ainsi que la NML (n=10) ne bloquent pas le courant provenant du mutant SK2H337N (p > 0.05)

La présence d'une histidine commune à tous les SK dans la région S5-Boucle P est donc essentielle pour le binding et le blocage subséquent du courant par l'apamine et d'autres bloqueurs organiques.



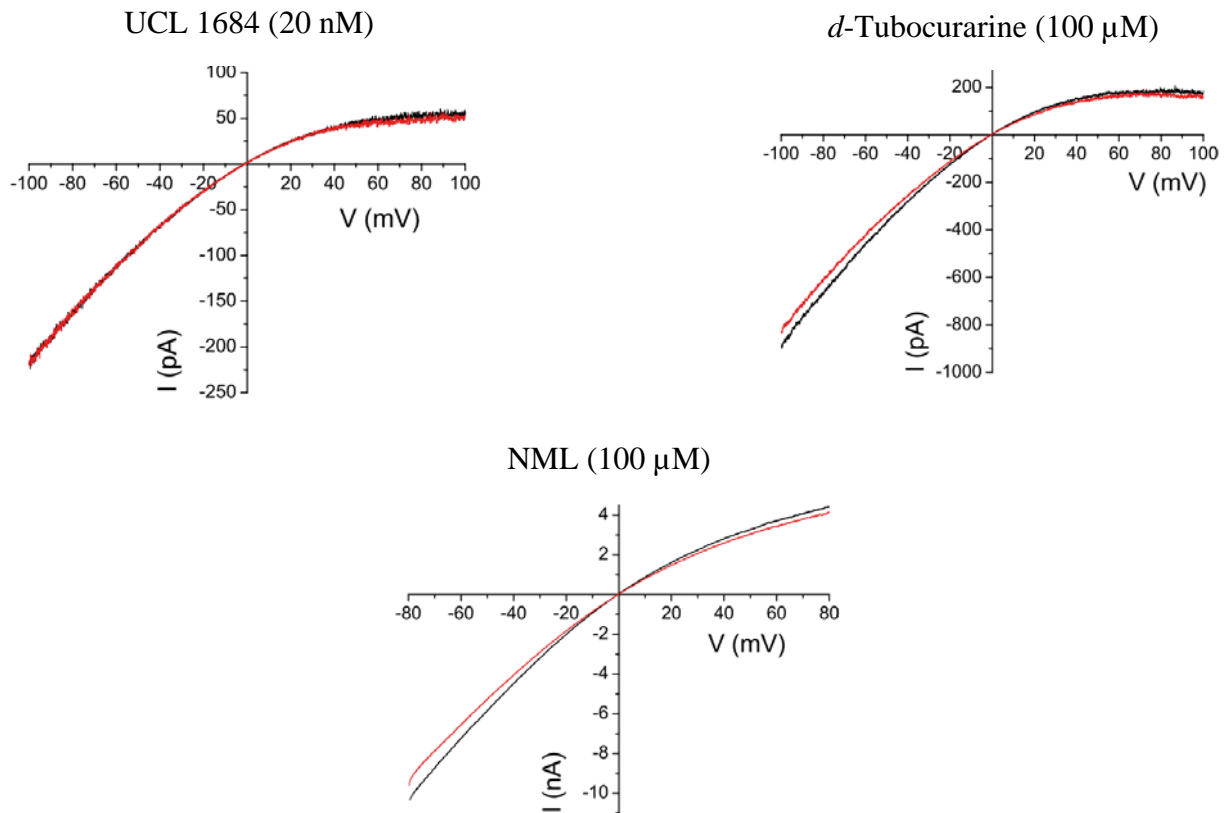
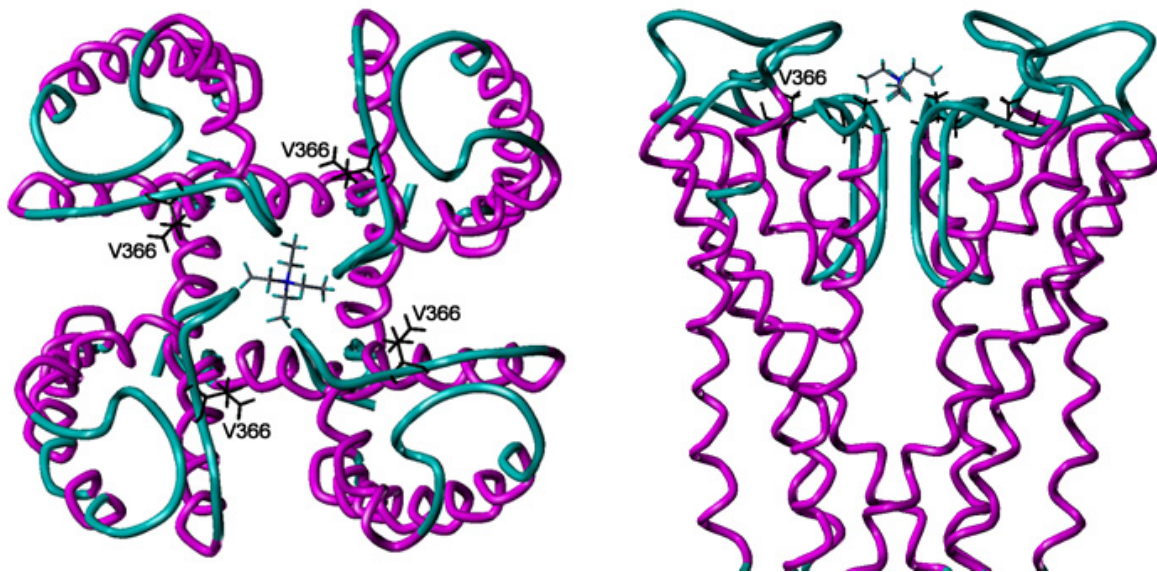


Figure 43 : Exemples de traces de courant obtenues à l'aide de rampes de -100 à + 100 mV en présence (en rouge) ou en absence (en noir) de bloqueurs.

## 6.7 Le mutant SK2H337N reste sensible à l'application de TEA extracellulaire

La mutagenèse dirigée est un outil précieux dans le cadre de ce type d'étude. Elle reste néanmoins sujette à une critique majeure. En effet, la mutation permet dans notre cas d'identifier un site d'interaction sur un mutant et d'extrapoler cette position au canal sauvage. Le risque est que la mutation change la structure de la cible de façon drastique rendant les ligands inefficaces. Dans notre cas, la mutation se situe dans la région externe du pore, il est donc vraisemblable qu'une modification importante de la structure entraînerait une modification de la forme du pore. Nous avons donc utilisé le TEA comme une sorte de « compas moléculaire » qui nous permet de sonder la géométrie de l'intérieur du pore. En effet, une modification structurale du pore devrait entraîner une différence d' $IC_{50}$  entre le canal mutant et le sauvage. En effet, le TEA est vraisemblablement un bloqueur de pore (Ahern et al., 2006; Heginbotham and MacKinnon, 1992; Lenaeus et al., 2005; Monaghan et al., 2004). Dans les canaux potassiques voltage-dépendants *shaker*, il a été démontré qu'une interaction de type cation- $\pi$  était responsable du blocage de haute affinité par le TEA qui interagit avec le résidu aromatique TYR 449 (Ahern et al., 2006). Au niveau des canaux SK,

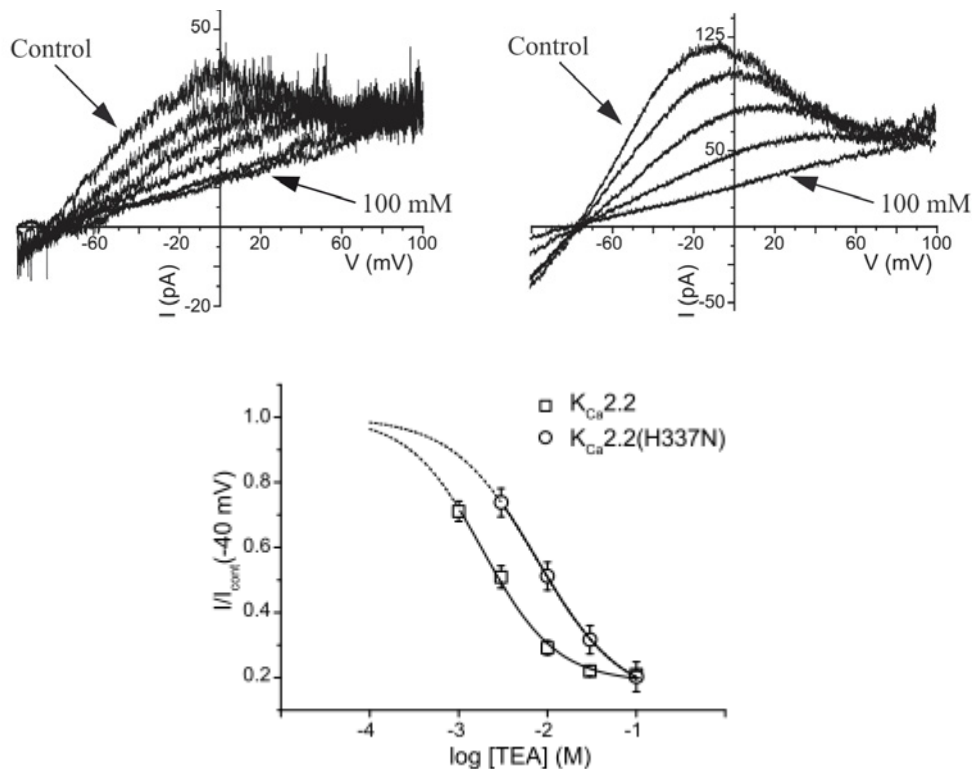
la position équivalente a été identifiée, il s'agit de la V520 pour SK3 et V366 pour SK2. De par sa structure isopropyle, ce résidu ne permet pas la création de liaisons autres qu'hydrophobes, ceci pourrait d'ailleurs expliquer l' $IC_{50}$  très élevée (ordre du mM) du TEA envers les canaux SK. Comme nous le verrons plus loin, la mutation SK3V520F permet d'augmenter la sensibilité au TEA, ce qui confirme que ce site est bien occupé par ce dernier (Monaghan et al., 2004). Cette position est donc un site d'interaction vraisemblable, situé dans notre modèle, juste au dessus du filtre de sélectivité (figure 44). Il peut, dès lors, nous servir à sonder la bouche externe du pore.



**Figure 44 : Figure adaptée d'un docking du TEA sur SK2 réalisé par S. Dilly montrant les résidus valine créant des interactions hydrophobes avec les groupements éthyloxy du TEA.**

Les essais effectués sur le mutant SK2H337N insensible à l'apamine ont permis de montrer que ce dernier restait sensible au TEA. Cependant, une différence d' $IC_{50}$  entre ce mutant et le sous-type sauvage a été mise en évidence, suggérant que la mutation affecte légèrement la forme du pore. La figure 45 nous montre des courants enregistrés en configuration « outside-out » (notez les plus petites valeurs de courant qu'en « whole-cell ») à partir du canal sauvage et du canal muté en condition de bas  $K^+$ . Le résumé des expériences est donné par une courbe d'inhibition concentration-réponse. La figure 45 nous montre une succession de traces d'un courant progressivement inhibé par une concentration croissante de TEA appliquée sur un canal SK2 sauvage (A) et du mutant (B). La partie C représente la courbe d'inhibition concentration-réponse obtenue par la mesure des courants à -40 mV. Les valeurs d' $IC_{50}$  obtenues sont de  $1.9 \pm 0.24$  mM avec un coefficient de Hill égal à  $1.1 \pm 0.1$  pour SK2 et de  $7.7 \pm 0.6$  mM avec un coefficient de Hill de  $0.9 \pm 0.1$  pour le canal muté. Ces

valeurs sont significativement différentes ( $P < 0.001$ ,  $n=3$ ) pour l' $IC_{50}$  mais aucune différence entre les coefficients de Hill n'a été détectée.



**Figure 45 :** En haut : traces représentatives du blocage des courants induits par des rampes de voltage de -100 à +100 mV en configuration « outside-out » et progressivement inhibés par des concentrations croissantes de TEA (1 (excepté SK2H337H), 3, 10, 30, 100 mM) sur SK2 (en haut à gauche) et sur SK2H337N (en haut à droite) (réalisées par S. Goodchild). En bas : courbes concentration-réponse.

### 6.8 L'apamine et le TEA n'interagissent pas avec la même région du canal : démonstration par des expériences de cinétique de blocage

La création du mutant SK2H337N nous a permis d'identifier un site d'interaction commun à l'apamine et à d'autres bloqueurs organiques. Ce mutant reste cependant sensible au TEA montrant que les deux classes de molécules agissent à des endroits différents. Comme nous l'avons évoqué, la mutagenèse dirigée pose le problème d'une possible modification de la structure globale de la protéine. La différence d' $IC_{50}$  du TEA pour le SK2 sauvage et le SK2H337N indique qu'une légère modification structurale dans la région externe du pore est

possible. Nous avons donc décidé d'aborder le problème par une autre approche décrite par Miller en 1988 qui utilise la cinétique de liaison ( $\tau_{on}$ ) afin de déterminer si deux ligands entrent en compétition pour le même site d'interaction. Le postulat de base est assez simple, il considère que si deux ligands partagent un ou plusieurs sites d'interactions, la liaison de l'un ne peut se faire que si le site commun n'est pas occupé par l'autre. Cela peut être résumé, dans notre cas, par l'équilibre suivant équation 4 :



**Équation 4 :** « C:TEA » représente le canal lié par le TEA, «  $C_{un}$  » représente le canal libre et « C:APA » représente le canal lié par l'apamine.

Une concentration non saturante de TEA va donc entraîner un blocage partiel du courant, qui est exprimé par le rapport du courant mesuré sur le courant contrôle ( $i/i_{cont}$ ). Cependant, dans le cas de deux ligands agissant sur le même site, ce rapport est aussi le reflet de la probabilité de présence de canaux non bloqués. Si ce rapport est de 1, le courant mesuré égale le courant contrôle et donc la probabilité d'avoir des canaux libres est maximale. L'inhibition du courant entraîne donc une diminution de ce rapport et une diminution de la probabilité d'avoir des sites libres disponibles pour l'autre bloqueur.

Dans le cadre de l'expérience qui détermine si l'apamine et le TEA partagent un même site d'interaction, nous avons utilisé le TEA comme premier ligand appliqué car il montre des  $\tau_{on}$  et  $\tau_{off}$  (cinétique de dissociation) très petits tandis que le  $\tau_{on}$  de l'apamine est de l'ordre de la seconde, ce qui permet de réaliser des expériences de cinétique assez facilement avec un système de perfusion ayant un taux d'échange de l'ordre de 10 ms. Dès lors, la probabilité d'avoir des sites libres peut se décrire par la l'équation 5 :

$$i/i_{cont} = p(C_{un}) = \frac{1}{1 + \frac{[TEA]}{K_{D,app}}}$$

**Équation 5 :** Equation décrivant la probabilité de sites libres. Avec : «  $i/i_{cont}$  » étant le rapport du courant mesuré sur le courant contrôle, «  $p(C_{un})$  » représentant la probabilité d'avoir des sites libres, « [TEA] » la concentration en TEA et «  $K_{D,app}$  » le  $K_D$  apparent du TEA.

En résumé, le  $\tau_{on}$  de l'apamine subséquent à un blocage de courant induit par le TEA, sera dépendant de la probabilité d'avoir des canaux libres ( $p(C_{un})$ ) et donc inoccupés par le TEA.

La relation classique décrivant, dans notre cas, le  $\tau_{on}$  de l'apamine est reprise par l'équation 6 :

$$\tau_{on} = \frac{1}{k_{-1} + k_{+1}[APA]}$$

**Équation 6 : Equation de cinétique décrivant la cinétique de liaison de l'apamine «  $\tau_{on}$  » avec «  $k_{+1}$  » étant la constante de dissociation, «  $k_{-1}$  » la constante d'association et « [APA] » la concentration en apamine.**

Si l'apamine et le TEA agissent sur le même site, cette relation doit être modifiée dans le cas d'un blocage partiel du courant dû à une concentration constante de TEA (équation 7).

$$\tau_{on} = \frac{1}{k_{-1} + k_{+1}[APA]p(C_{un})}$$

**Équation 7 : Equation de cinétique décrivant la cinétique de liaison de l'apamine «  $\tau_{on}$  » avec «  $k_{+1}$  » étant la constante de dissociation, «  $k_{-1}$  » la constant d'association, « [APA] » la concentration en apamine et «  $p(C_{un})$  » la probabilité d'avoir un canal libre.**

Dans cette équation, la concentration d'apamine appliquée est transformée en concentration apparente dépendante de la probabilité d'avoir des sites libres. En effet, la constante de liaison est dépendante de la concentration du ligand. En résumé, dans une relation simple bi-moléculaire, la vitesse de liaison d'un ligand sera dépendante de sa concentration tandis que la vitesse de dissociation en est indépendante.

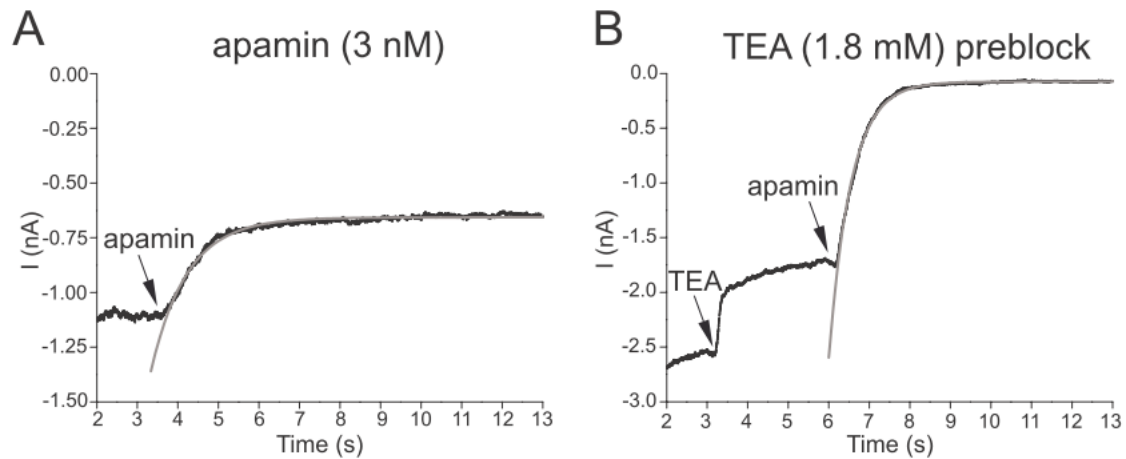
Plus la  $p(C_{un})$  sera basse, en d'autres termes plus la concentration en TEA sera élevée, plus la concentration apparente en apamine va diminuer et plus le  $\tau_{on}$  va augmenter. La cinétique de liaison dans ce cas peut être déterminée à l'aide d'une fonction exponentielle du premier degré dont la formule de base a été adaptée pour la circonstance (équation 8).

$$Y = Y_0 + Ae^{-x/t} \qquad I(t) = I_{plateau} + I_0e^{-t/\tau}$$

**Équation 8 : Equation exponentielle du premier degré (à gauche) et son adaptation pour les expériences de cinétique.  $I(t)$  représente le courant en fonction du temps,  $I_{plateau}$  représente le courant final,  $t$  le temps,  $I_0$  le courant initial et  $\tau$  la constante de temps.**

Les résultats que nous avons obtenus lors de ces expériences nous confirment que le TEA et l'apamine ne partagent pas un même site d'interaction. En effet, la cinétique de liaison de l'apamine ne change pas si le courant est préalablement bloqué par du TEA. Le  $\tau_{on}$  moyen obtenu pour l'application d'apamine (3 nM) seule est de  $0.70 \pm 0.12$  s. (n=6). Un blocage

préalable partiel par 1.8 mM de TEA (dont l'application est maintenue pendant toute la durée de l'expérience) n'induit pas de modification de la cinétique de blocage de l'apamine dont le  $\tau_{on}$  moyen devient  $0.79 \pm 0.08$  s. (n=8). Il n'y a pas de différence significative entre ces deux valeurs (P = 0.51). Les deux traces ci-dessous illustrent chacune une expérience (figure 46)

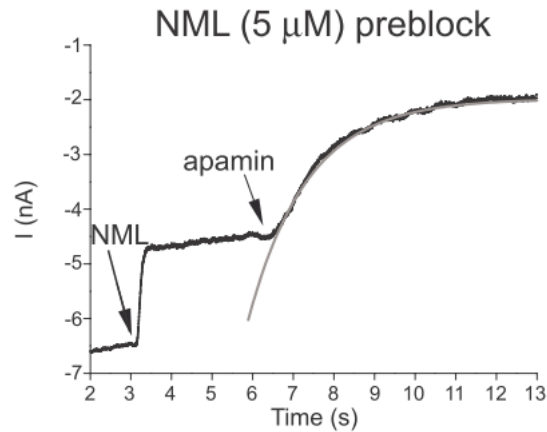


**Figure 46 :** Courants enregistrés à -50 mV sur SK3. A représente l'expérience avec l'apamine seule, et B le blocage de l'apamine subséquent au blocage par le TEA (maintenu pendant l'application d'apamine). Les « fittings » en gris ont été réalisés à l'aide d'une exponentielle du premier degré.

Le fait qu'il n'y ait pas de différence de cinétique pour l'application de l'apamine en présence de TEA concorde bien avec le fait que ce dernier a la capacité de bloquer un canal muté insensible à l'apamine. Cette même expérience menée sur SK2 par nos collègues à l'Université de Bristol nous montre un résultat identique.

Un contrôle positif de cette expérience a également été réalisé en remplaçant le TEA par la NML. En effet, la NML semble partager au moins un site d'interaction avec l'apamine car le mutant SK2H337N, insensible à l'apamine, l'est également pour ce composé. De plus, la NML déplace l'apamine dans des expériences de « binding » (Graulich et al., 2005).

Le pré-blocage du courant avec 5  $\mu$ M de NML nous montre une augmentation significative (test t de Student donnant un P = 0.0002) de la cinétique de liaison de l'apamine avec un  $\tau_{on}$  de  $1.36 \pm 0.08$  s. (n=10) (figure 47).



**Figure 47 : La NML (5  $\mu$ M) ralentit la cinétique de liaison de l'apamine.**

Selon la théorie, la capacité du compétiteur à ralentir le  $\tau_{on}$  du bloqueur étudié dépend de la probabilité d'occupation du site par ce dernier. Cette probabilité dépend évidemment de la concentration du compétiteur ; si celle-ci augmente, le ralentissement devrait être plus marqué.

Le  $\tau_{on}$  moyen de l'apamine seule est de  $0.70 \pm 0.12$  s. (n=6); en présence de 1.8 mM de TEA il est de  $0.79 \pm 0.08$  s. (n=8). Les concentrations de 5 et 7.5  $\mu$ M de NML donnent un  $\tau_{on}$  moyen pour l'apamine de  $1.36 \pm 0.08$  s. (n=10) et  $1.84 \pm 0.09$  s. (n=8) respectivement. Une analyse globale par ANOVA suivie d'un test post-hoc de Tukey montre que le  $\tau_{on}$  de l'apamine n'est pas affecté par le TEA ( $P > 0.05$ ) mais est significativement affecté par les deux concentrations de NML ( $P < 0.001$ ).

De plus, l'analyse montre également que les  $\tau_{on}$  des deux concentrations de NML sont également significativement différents ( $P < 0.001$ ), ce qui signifie que l'augmentation du  $\tau_{on}$  de l'apamine est fonction de la concentration en NML comme le prédit la théorie (figure 48).

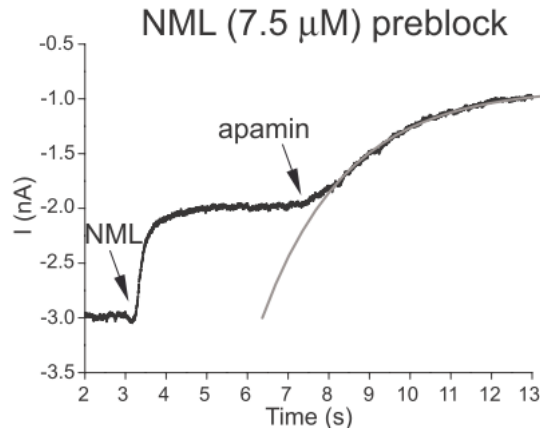


Figure 48 : Le pré-blocage par une concentration de NML (maintenue pendant toute l'expérience) supérieure à la précédente augmente le  $\tau_{on}$  de l'apamine d'une façon plus marquée.

Le graphique ci-dessous résume l'ensemble des expériences de cinétique réalisées sur SK3 (figure 49) :

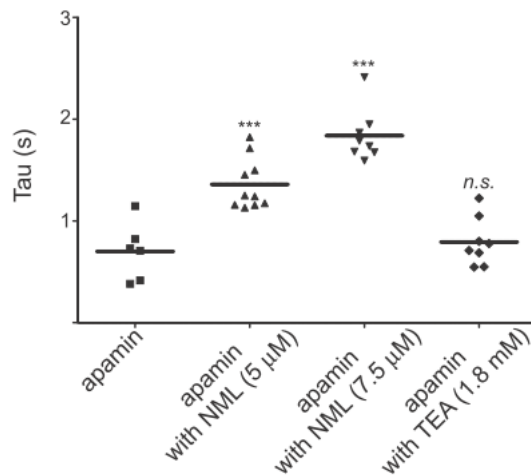


Figure 49 : Résumé des expériences de cinétiques sur SK3. \*\*\* :  $P < 0.001$  et n.s. : non significatif.

## 6.9 Expériences de modélisation et de « docking »

Travaux réalisés en collaboration avec S. Dilly (ULg) et D. Jane (U. Bristol).

Les canaux SK n'ont pas encore été cristallisés. Il n'est donc pas possible de créer une structure tridimensionnelle au départ de données cristallographiques. Afin de visualiser les emplacements et de réaliser des expériences de « docking », il faut donc créer un modèle sur base de données structurales existantes provenant d'autres canaux.



Nos modélisateurs ont dû recourir à la technique dite d'homologie comparative. Cette technique permet de prédire la structure 3D d'une protéine sur base de sa séquence en acides aminés et de la structure d'une protéine similaire dont la structure a déjà été résolue (cristallographie par rayons X ou RMN) et typiquement publiée sous forme de fichier PDB (Protein Data Bank). Plus la séquence de la protéine d'intérêt est proche de la protéine parent, plus les chances d'obtenir une structure 3D *in silico* proche de la réalité sont élevées.

Brièvement, un modèle est produit en quatre étapes successives (Baker and Sali, 2001). La première consiste en l'identification d'une protéine parent dont la structure est connue. La séquence de cette dernière est ensuite alignée avec celle de la protéine à modéliser. Dans notre cas, deux canaux potassiques cristallisés sont disponibles. Il s'agit du canal Kv1.2 (identifiant PDB : 2a79, canal ouvert, précision de 2.9 Å) (Long et al., 2005a) et du canal KcsA (identifiant PDB : 1bl8, canal fermé, précision de 3.2 Å) (Doyle et al., 1998). Un minimum de 30 % d'homologie entre les séquences doit être respecté pour la validité du modèle (Baker and Sali, 2001). Cette étape est suivie par la génération du « backbone » à partir de la protéine parent, ce qui signifie que les positions des carbones alpha ( $C_\alpha$ ) ainsi que les angles phi (angle entre N-H et le  $C_\alpha$ ) et psi (angle entre le C=O et  $C_\alpha$ ) sont, à ce stade, identiques. L'ajout des chaînes latérales de la protéine d'intérêt au « backbone » est le stade suivant. Ceci va entraîner l'apparition de contraintes au sein du modèle étant donné que les chaînes latérales ne sont pas identiques entre les deux protéines. Il faudra donc réaliser une minimisation d'énergie où le « backbone » peut alors devenir différent de la protéine parent pour obtenir une structure dont l'énergie est la plus basse possible. L'étape finale est la détection d'éventuelles aberrations physico-chimiques dans la structure générée. Nos deux modèles correspondent aux parties S5-FS-S6 du canal. L'entièreté de la séquence du KcsA a été utilisée car ce canal ne possède que 2DTM et seulement le segment S5-FS-S6 dans le cas de Kv1.2. L'homologie des autres segments est trop faible que pour pouvoir utiliser la technique d'homologie comparative. La structure de l'apamine résolue par RMN et utilisée dans les expériences de « docking » nous a été gracieusement donnée par le Dr D. Wemmer (UC Berkeley).

Comme expliqué ci-dessus, deux structures parentes aux canaux SK ont été utilisées entraînant donc la génération de deux modèles. Comme nous allons le voir, le « docking » de l'apamine n'est pas totalement identique pour les deux modèles. Le propos tenu ici, n'est pas

de discuter si l'un ou l'autre modèle se rapproche plus de la réalité, il s'agit plutôt de mettre en évidence que le positionnement global de l'apamine dans les deux modèles est similaire et décentré par rapport à la bouche du pore. Les dockings de l'apamine avec le modèle basé sur Kv1.2 (figure 50) ou sur KcsA (figure 51) ne montrent en aucun cas que cette dernière obstrue le pore directement.

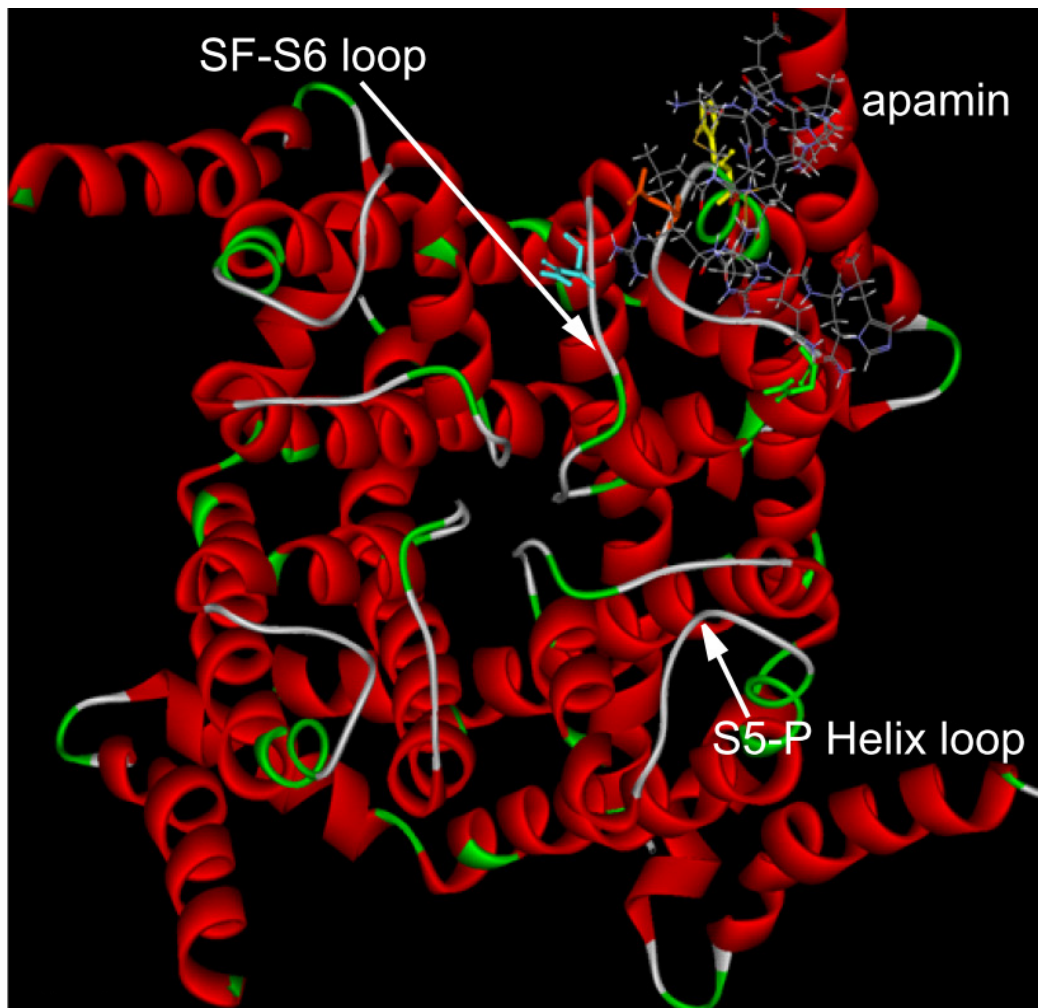


Figure 50 : Docking de l'apamine sur le canal SK2 modélisé à partir de Kv1.2 (D. Jane)

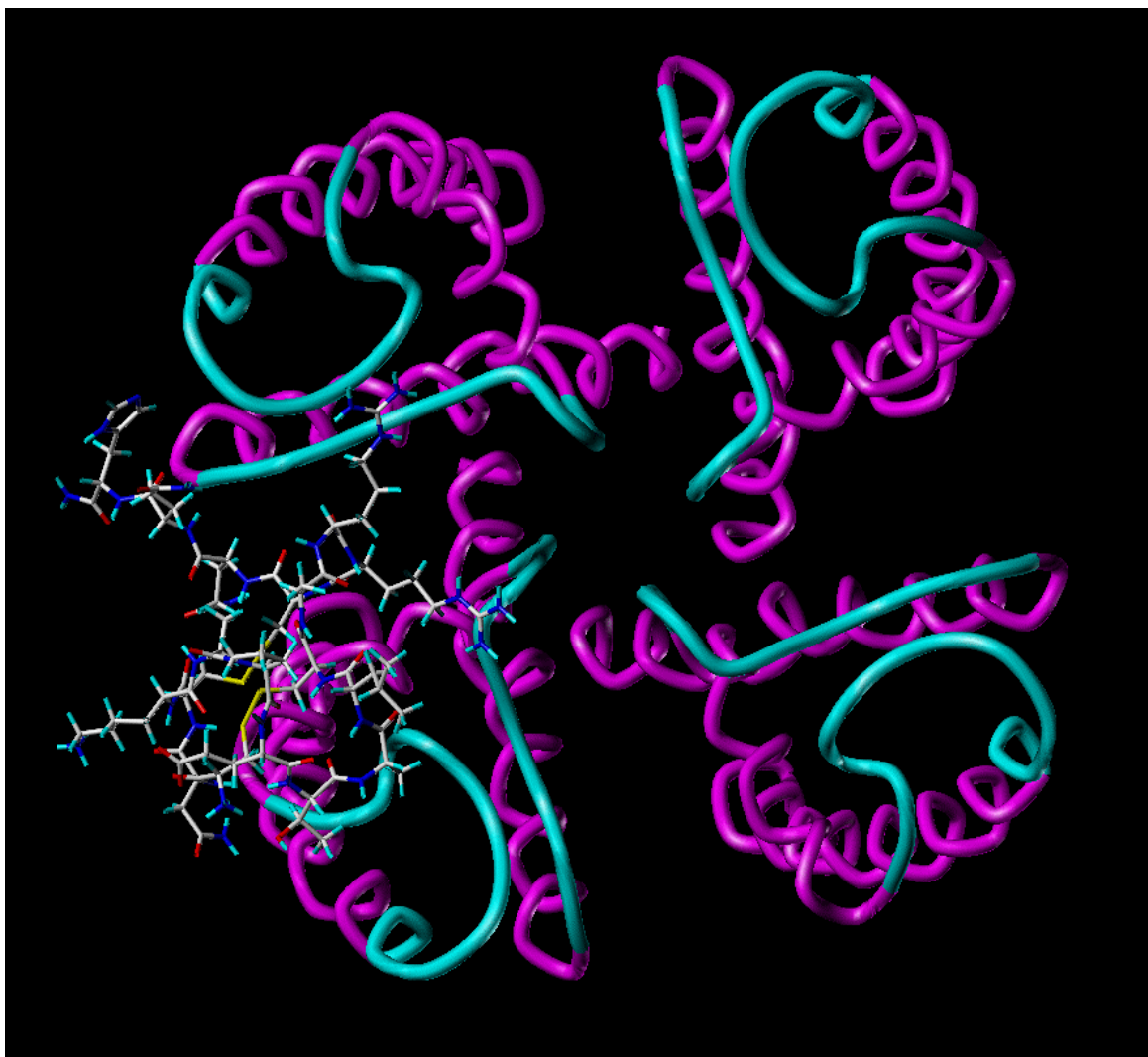


Figure 51 : Docking de l'apamine sur le canal SK2 modélisé à partir de KcsA (S. Dilly).

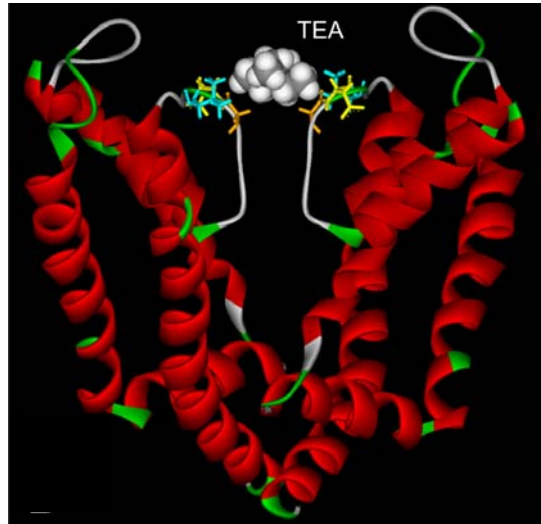
Le tableau ci-dessous nous montre les solutions d'interactions proposées pour les deux modèles (tableau 4).

Séquence de l'apamine	KcsA	Kv1.2
C1		D338
N2	Y336 – N345	H337
C3		
K4		
A5		
P6		
E7		
T8	N345	
A9		
L10		
C11		
A12		
R13	Q340 – D341	
R14	D364 – N368- D341	Q339 – Q340
C15	N368- K373	
Q16		
Q17	D338 – Q339 – Y370	N345
H18	H337	

**Tableau 4:** Tableau reprenant les interactions entre l'apamine et le modèle. Les interactions ioniques sont représentées en rouge et les ponts hydrogènes en noir, les résidus surlignés en jaune correspondent aux positions discutées dans le texte.

Notre hypothèse de travail étant que l'apamine agit comme un bloqueur allostérique et non pas comme un bloqueur de pore, nous avons également réalisé le « docking » du TEA. Ce dernier se place juste au dessus du filtre de sélectivité dans nos deux modèles modélisant la partie S5-SF-S6 du canal SK2.

Les deux modèles montrent une interaction des groupements éthyloxy avec le résidu valine 366 (figure 52), déjà décrite comme étant un site d'interaction du TEA sur SK3 à l'aide d'expériences de mutagenèse dirigée (Monaghan et al., 2004).



**Figure 52 : Interaction du TEA avec deux sous-unités (S5-FS-S6) de SK2 en vue latérale du canal (créé à partir de Kv1.2 par D. Jane).**

#### 6.10 Validation du modèle par le TEA

Afin de valider nos modèles de canaux et prouver que le TEA agit bien comme un bloqueur de pore, nous avons créé le mutant décrit par Monaghan (SK3V520F) et réalisé des expériences en patch-clamp afin de vérifier si nous pouvions reproduire ces expériences. Les mutants SK3V520F et SK3V520A (mutation originale) ont donc été créés afin de respectivement augmenter et diminuer les interactions hydrophobes entre les groupements éthyloxy du TEA et les résidus valines du canal. Ces expériences ont bien confirmé que le remplacement de la valine par une phénylalanine augmentait la sensibilité du canal par rapport au WT (test t de Student  $P = 0.038$ ,  $n=3$ ). Bien qu'une tendance soit observée, le mutant SK3V520A n'augmente pas la valeur d' $IC_{50}$  et nécessiterait d'autres expériences vu la distribution assez large des valeurs obtenues (figure 53).

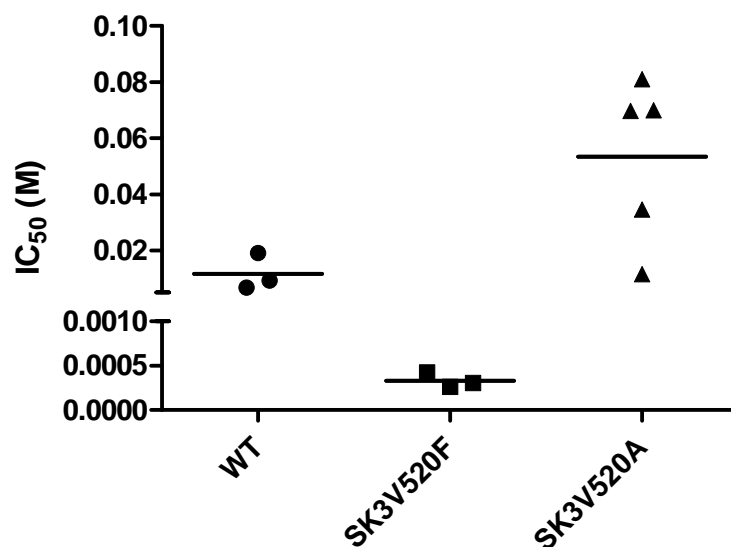
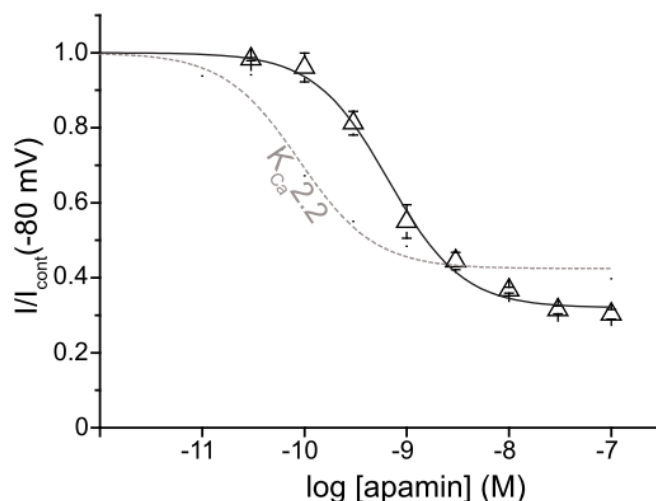


Figure 53 : Distribution des IC<sub>50</sub> obtenues lors de l'inhibition des canaux par le TEA

### 6.11 Validation de nos modèles de canaux par mutagenèse d'un site d'interaction découvert *in silico*

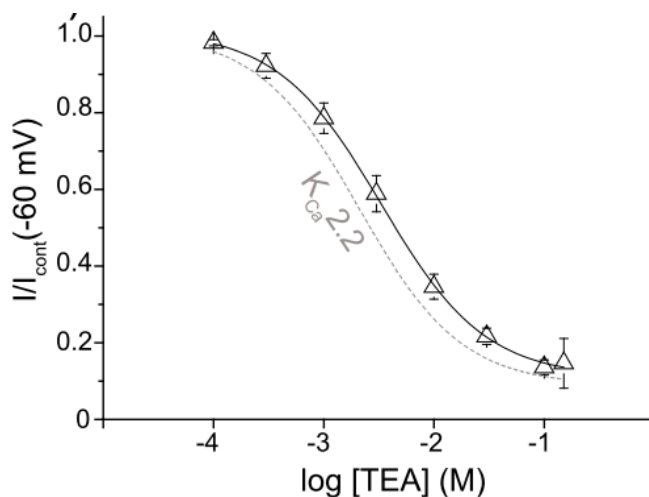
L'asparagine 345 sur SK2 a été identifiée comme site d'interaction lors du « docking » de l'apamine. Ce site a été trouvé lors des « dockings » basés aussi bien sur le modèle créé à partir de Kv1.2 que de KcsA.

Nous avons donc créé le mutant SK2N345G afin de vérifier si notre modèle *in silico* se rapprochait de la réalité. Une courbe concentration-réponse avec l'apamine (figure 54) a été réalisée et nous avons obtenu une IC<sub>50</sub> moyenne de  $4.5 \pm 0.8$  nM avec un coefficient de Hill de  $1.30 \pm 0.06$  (n = 10). Cette mutation réduit significativement la sensibilité à l'apamine par rapport au canal sauvage ayant une IC<sub>50</sub> moyenne de 107 pM (P < 0.001 avec un test t de Student)



**Figure 54 : Courbe concentration-réponse de l'effet de l'apamine sur le mutant SK2N345G. Le canal sauvage est illustré en gris pour comparaison.**

A l'instar de ce que nous avons réalisé sur le canal SK2H337N, nous avons également testé le TEA sur ce mutant afin de déterminer si la forme du pore externe n'était pas altérée par la mutation. La courbe concentration-réponse du TEA pour le SK2N345G n'est pas différente de celle du WT (figure 55) indiquant que cette portion externe du pore n'est pas affectée par la mutation. Les valeurs obtenues d'IC<sub>50</sub> de  $3.8 \pm 1$  mM (n=4) ne diffèrent pas de la valeur du canal sauvage qui était de  $2.2 \pm 0.3$  mM (n = 3) (P = 0.84).



**Figure 55 : Courbe concentration-réponse de l'apamine pour SK2N345G avec la courbe SK2 (en gris) pour comparaison.**

Nous avons également évalué si cette mutation affectait le « binding » de l'apamine et n'avons pas pu mettre en évidence une quelconque différence (P = 0.75 dans un test t de

Student), ce qui suggère que cette position est probablement impliquée, non pas dans la fixation, mais dans la translation de la fixation en blocage du canal (figure 55).

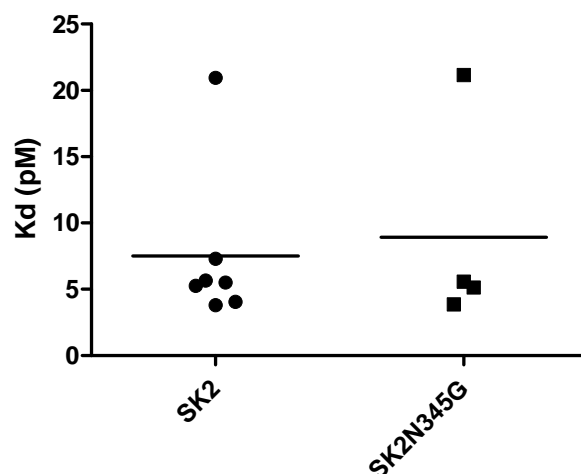


Figure 56 : Le mutant SK2N345G montre un  $K_d$  de  $8.9 \pm 4.1$  pM ( $n = 4$ ) qui ne diffère pas significativement de celui du canal SK2 sauvage qui est de  $7.5 \pm 2.3$  pM ( $n=7$ ).

### 6.12 La position SK2N368 est importante pour la haute sensibilité de SK2 vis-à-vis de l'apamine

La position N368 au niveau du pore externe a déjà été identifiée sur le canal SK2 comme étant une position importante responsable de la plus haute sensibilité de ce sous-type par rapport au hSK1 (Ishii et al., 1997b). De plus, ce résidu est la seule différence entre SK2 et SK3 au niveau de la séquence FS-S6. En effet, cette asparagine sur SK2 correspond à une histidine sur SK3 en position 522 et pourrait être à l'origine d'une plus grande sensibilité de SK2 vis-à-vis de l'apamine par rapport à SK3. Nous avons donc créé un mutant SK2 portant une histidine en position 368 (SK2N368H) pour imiter la séquence de SK3 à ce niveau, et inversement, un mutant SK3 ayant une asparagine en position 522 (SK3H522N) pour imiter la région de SK2 au niveau de FS-S6 (Cfr. : protons) (figure 57).

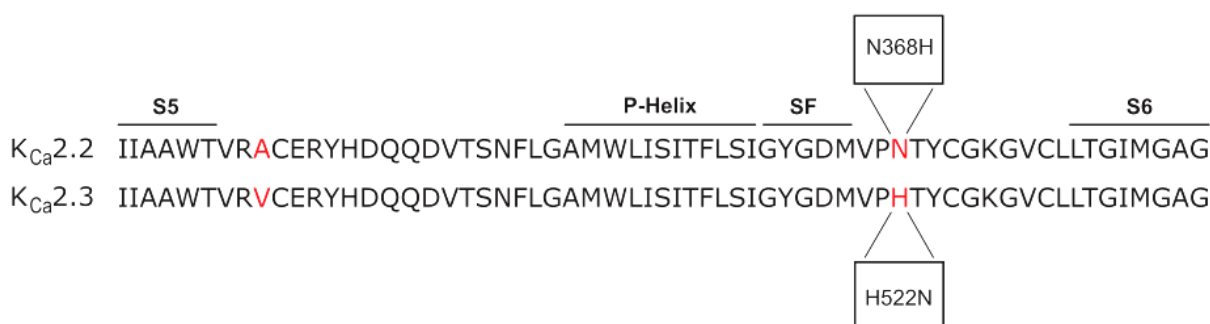


Figure 57 : Alignement des séquences de SK2 et SK3 montrant les mutations effectuées.



Dans des expériences de binding, le mutant SK2N368H dont le  $K_d$  est de  $7.1 \pm 0.59$  pM (n=8) n'a pas montré de différence d'affinité avec SK2 (P=0.85) ou SK3 (P=0.47) (figure 58)

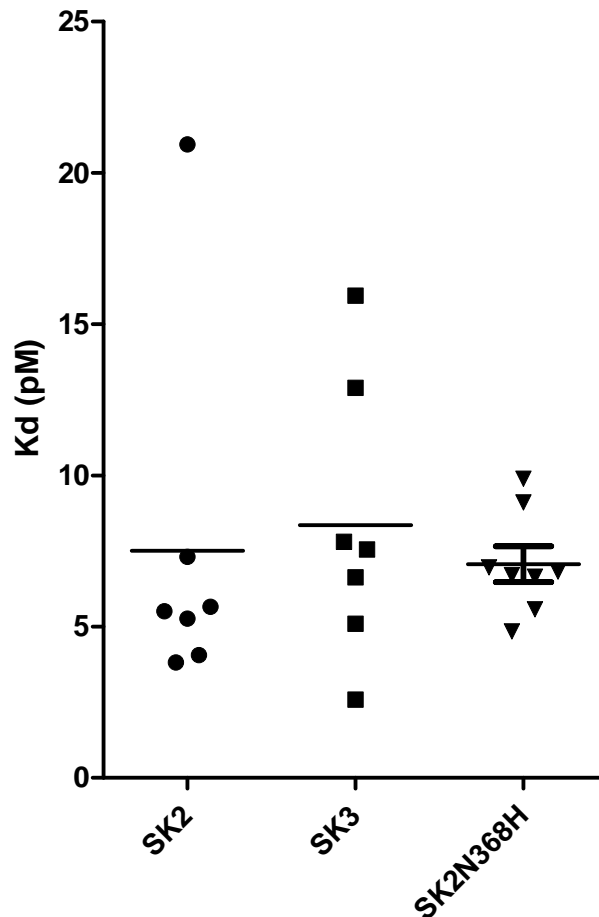
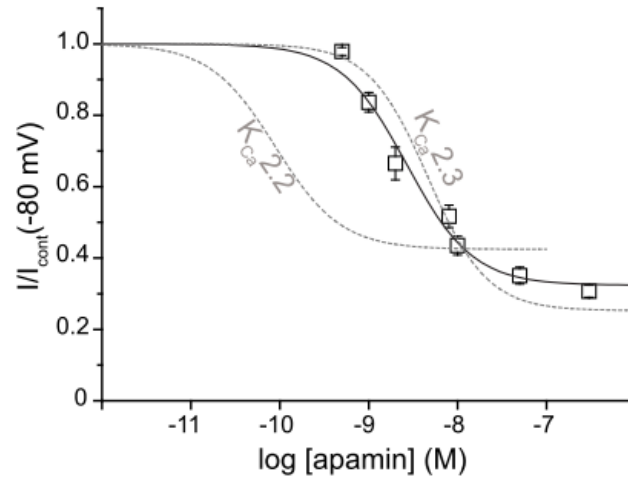


Figure 58 : Le mutant SK2N368H n'a pas montré de différence de  $K_d$  par rapport aux canaux sauvages SK2 et SK3.

La mutation ne semble pas affecter la capacité de la toxine à se lier au canal. Par contre, nous avons pu mettre en évidence une différence dans la sensibilité du canal muté vis-à-vis de l'apamine. La valeur d' $IC_{50}$  obtenue est de  $2.96 \pm 0.6$  nM ( $n_h = 1.47 \pm 0.21$ , n = 7) et est significativement différente de celle du canal de départ ( $IC_{50}$  moyenne sur SK2 sauvage 107 pM) (P < 0.001). Cependant, il n'y a pas de différence significative par rapport au canal sauvage SK3 (P = 0.09) (figure 59).



**Figure 59 :** Courbe d'inhibition du mutant SK2N368H avec en gris les courbes des canaux sauvages SK2 et SK3 pour comparaison.

Ces données permettent donc de montrer que cette position est critique pour la sensibilité supérieure de SK2 par rapport à SK3. De plus, elles suggèrent que nous pourrions augmenter la sensibilité du sous-type SK3, en imitant SK2 dans la zone SF-S6, par la mutation SK3H522N (figure 60).



**Figure 60 :** La mutation SK3H522N permet d'imiter la séquence du sous-type SK2 dans la région SF-S6.

La mutation SK3H522N n'a cependant pas montré de différence de sensibilité par rapport au sous-type sauvage SK3. Nous ne sommes donc pas parvenus à augmenter la sensibilité du canal pour l'apamine par cette mutation imitant SK2. Les valeurs d'IC<sub>50</sub> obtenues pour le mutant ne diffèrent pas (P = 0.35, test t de Student) de celles du type sauvage (6.1 ± 1.6 nM) avec une IC<sub>50</sub> moyenne de 4.2 ± 0.5 nM (n<sub>h</sub> = 1.67 ± 0.12, n = 8).

### 6.13 Discussion

Au début des années 2000, l'apamine était décrite comme un bloqueur direct de pore. Cette hypothèse a été émise suite à des travaux de mutagenèse dirigée (Ishii et al., 1997b; Jager and Grissmer, 2004). Cependant, un travail récent a montré qu'une mutation au niveau de la boucle extracellulaire située entre S3 et S4 affectait la sensibilité de hSK1 vis-à-vis du peptide (Nolting et al., 2007). Etant donné que l'apamine n'est probablement pas assez volumineuse pour se lier à la fois au niveau du filtre de sélectivité et à cette boucle extracellulaire, il est apparu envisageable que l'apamine ne se lie pas directement au dessus du pore.

Nous avons identifié deux résidus influençant la sensibilité de l'apamine : SK2H337 et son homologue SK3H491 ainsi que le SK2N345. Les courants enregistrés des mutants SK2H337N et SK3H491N sont insensibles à 100 nM d'apamine montrant l'importance de ce résidu histidine dans cette partie extracellulaire du pore. Des expériences de « binding » ont montré que l'absence d'effet était en fait liée à une absence de liaison de la toxine avec les canaux. Une mutation supplémentaire par un autre acide aminé, une arginine, a montré que les particularités de l'histidine (majoritairement non protoné à pH physiologique) étaient cruciales pour le binding et le blocage de l'apamine.

Deux modèles du canal SK2 obtenus par homologie comparative (à partir de 2 canaux  $K^+$  différents) ont montré que l'apamine se positionnait de façon distale par rapport à la bouche du pore sur le segment S5 et la boucle P. Un de ces modèles a été en partie validé par la mutation d'un acide aminé trouvé par « docking ». Il s'agit de l'asparagine 345 qui diminue l'efficacité de l'apamine quand elle est mutée en glycine (SK2N345G). L'étude réalisée par Nolting et al. montre qu'une sérine au niveau de la boucle entre S3 et S4 est nécessaire pour obtenir un blocage de haute affinité de l'apamine (nous pensons d'ailleurs qu'une étude de « binding » sur ce mutant serait riche en information). La structure de Kv1.2, qui a été résolue par cristallographie, nous montre que cette boucle pourrait venir en contact de la région S5-boucle P. Le « docking » de l'apamine sur SK2, modélisé à partir de ce canal nous montre que l'arginine 13 (décrite comme importante dans l'activité de l'apamine) est projetée loin du pore, ce résidu pourrait donc éventuellement interagir dans la zone de la boucle S3-S4. Il n'y a donc pas de contradiction entre les résultats de notre étude et ceux de (Nolting et al., 2007).

Un autre point intéressant est que le mutant SK2H337N semble non seulement abolir l'effet de l'apamine mais également celui d'autres bloqueurs de canaux SK comme la *d*-tubocurarine, l'UCL1684 et la NML. Le fait que cette mutation affecte également ces bloqueurs n'est pas une surprise car ces composés peuvent tous déplacer l'apamine lors d'expériences de « binding » (Cook and Haylett, 1985; Graulich et al., 2005; Ishii et al., 1997b; Sorensen et al., 2008b). Comme nous l'avons montré, il est peu probable que l'apamine agisse comme un bloqueur de pore, il est donc possible que ces molécules se comportent de la même façon. Comme nous l'avons évoqué, une mutation pourrait affecter la forme du pore. Dès lors, nous avons utilisé le TEA pour, en quelque sorte, sonder l'intégrité du pore. Avant cette étape, nous devons nous assurer que le TEA et l'apamine n'interagissaient pas au niveau du même site. Deux expériences nous ont permis d'exclure l'hypothèse d'un site commun. La première est que le TEA est capable de bloquer un canal insensible à l'apamine (SK2H337N) et la seconde est apportée par des expériences de cinétique où le TEA ne modifie pas la vitesse de blocage du courant par l'apamine. Par contre, la NML ralentit la cinétique de bloc, prouvant ainsi sur un canal sauvage que la NML et l'apamine agissent au moins sur un site commun. Le TEA s'est montré moins puissant vis-à-vis du mutant par rapport au type sauvage ce qui suggère une légère altération de la forme du pore mais néanmoins largement inférieure à l'effet de la mutation sur l'action de l'apamine. Nous proposons donc que les composés que nous avons testés (TEA exclus) ne fonctionnent pas comme des bloqueurs de pore mais utilisent un mécanisme allostérique. Leur liaison entraînerait une modification de la forme du pore qui altère la perméation des ions  $K^+$ . Cette conclusion est confortée par le fait que les  $IC_{50}$  de SK2 et SK3 sont différentes mais que leurs  $K_d$  sont identiques. Ceci indique que la liaison des bloqueurs sur les canaux n'obstrue pas directement le pore – dans ce cas de figure le  $K_d$  devrait être proportionnel à l' $IC_{50}$  et proche de celui-ci -, et qu'il existe une étape distincte entre la liaison et le bloc, étape sans doute plus difficile à franchir pour l'apamine quand elle se fixe sur le canal SK3.

Le mécanisme que nous proposons est donc que la liaison de l'apamine au canal provoque un changement de conformation de ce dernier nécessitant des résidus impliqués dans la translation de la fixation en bloc du canal. Un exemple de ce type de résidu pourrait être la position SK2N345 dont la mutation n'affecte pas le binding de l'apamine, mais réduit son efficacité. Ceci n'est pas tout-à-fait cohérent avec les données de « docking ». En effet, d'après notre modèle, ce résidu interagit directement avec l'apamine, nous devrions donc nous attendre à ce que sa mutation entraîne une augmentation du  $K_d$ . Cette information

semble donc indiquer que ce résidu est impliqué dans la translation du phénomène. Cela montre peut-être que notre modèle n'est pas parfait, bien que cette position ait été identifiée par l'approche théorique). Le même raisonnement s'applique à la position SK3H522/SK2N368. Les mutations réalisées n'ont pas entraîné d'augmentation du  $K_d$  parallèle à une augmentation de l' $IC_{50}$ . Le mutant SK2N345G a vu sa valeur d' $IC_{50}$  augmenter et approcher celle observée pour SK3 tandis que son  $K_d$  n'a pas augmenté. Le même phénomène s'observe avec le mutant SK2N368H. Par contre, imiter la position 368 de SK2 au niveau de SK3 ne modifie pas l' $IC_{50}$ .

Le mécanisme de blocage de l'apamine est donc complexe et s'éloigne de la vue classique qui indique qu'un composé possédant une haute affinité présente un blocage direct important, comme cela est décrit pour la tétródotoxine (Hille, 2001). Il est plus que vraisemblable qu'elle se positionne ailleurs plutôt que dans le chemin des ions potassiques. Cette observation prend tout son intérêt dans le développement de bloqueurs dont l'objectif serait d'être sélectif pour un sous-type. En effet, l'approche de ce problème avec des molécules obstruant le pore a moins de chance d'aboutir étant donné le haut degré de conservation au niveau de cette région. Par contre, viser des zones se situant en dehors offre vraisemblablement des possibilités d'interaction différentielle pouvant peut-être aboutir à des molécules sélectives. Bien entendu, le modèle doit encore être affiné et le mécanisme de translation de l'effet de l'apamine, et peut-être des autres bloqueurs, n'a probablement pas encore livré tous ses secrets.

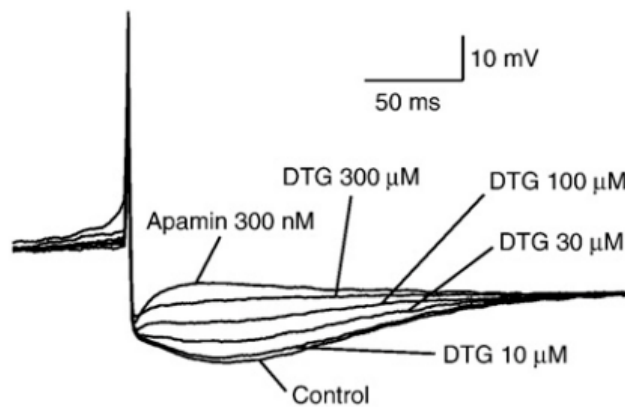
## 7 Résultats : Effet du 1,3-di-*o*-tolyl-guanidine (DTG) sur les courants SK

### 7.1 Introduction

Dans le décours de la recherche au sein de notre groupe, le Dr. Scuvée-Moreau a exploré les effets de divers ligands  $\sigma$  sur la mPHP des neurones dopaminergiques. Cette recherche a été réalisée suite à la démonstration que les canaux SK étaient impliqués dans le couplage des récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate) et  $\sigma$  au niveau de l'hippocampe (Martina et al., 2007). Le canal NMDA fait partie de la famille des récepteurs canaux activés par le glutamate. Deux autres membres de cette famille sont les récepteurs AMPA et kaïnate). Il est caractérisé par une grande perméabilité au calcium, une faible désensibilisation et un blocage par les ions  $Mg^{2+}$  fortement voltage dépendant (Wollmuth and Sobolevsky, 2004). Le flux d'ions calciques à travers les récepteurs NMDA est entre autres responsable des phénomènes de potentialisation (LTP) et de dépression (LTD) à long terme qui forment la base de la plasticité synaptique (Collingridge et al., 2004). Certaines études montrent au niveau de l'hippocampe que des ligands des récepteurs Sigma-1 ( $R\sigma$ -1) augmentent la réponse des récepteurs NMDA. Le mécanisme sous-jacent a été identifié dans cette région. L'activation des  $R\sigma$ -1 augmente les courants NMDA et le phénomène de LTP en empêchant les canaux SK de s'ouvrir (Martina et al., 2007). Les  $R\sigma$  sont largement distribués dans le système nerveux central et deux sous-types ont été identifiés :  $\sigma_1$  et  $\sigma_2$ . Ils semblent être impliqués dans la modulation de la sécrétion de neurotransmetteurs, dans la fonction de certains récepteurs, du transport des lipides, dans l'activité de canaux ioniques et dans l'homéostasie calcique. Plusieurs études suggèrent que les récepteurs  $\sigma$  pourraient moduler la fonction des neurones dopaminergiques. Tout d'abord parce que les deux sous-types présentent une densité d'expression élevée dans la substance noire compacte (Bouchard and Quirion, 1997), ensuite parce qu'il a été démontré que des ligands  $\sigma$  pouvaient moduler le mode de décharge des neurones dopaminergiques du mésencéphale (Minabe et al., 1999). De plus, l'administration de ligands  $\sigma$  au niveau du striatum module le taux basal de dopamine *in vivo* (Moison et al., 2003). Finalement, des ligands  $\sigma$  peuvent moduler la sécrétion de dopamine induite par le NMDA (Gonzalez and Werling, 1997) et également induire des effets moteurs impliquant la voie nigro-striée (Bastianetto et al., 1995).

Notre laboratoire a voulu, dans un premier temps, explorer la possibilité d'un lien entre les canaux SK et les récepteurs  $\sigma$  dans les neurones dopaminergiques. Vu l'implication

des canaux SK dans la mPHP, une première série d'expériences *in vitro* a été réalisée sur coupes de cerveau de rat et a consisté à examiner l'effet de divers ligands  $\sigma$  sur les potentiels d'actions et plus particulièrement sur la mPHP (enregistrements intracellulaires réalisés par J. Scuvée-Moreau). Ces expériences ont montré que l'application de l'agoniste  $\sigma$  non-sélectif 1,3-di-*o*-tolyl-guanidine (DTG) à la concentration de 100  $\mu\text{M}$  ( $n = 8$ ) induisait une réduction concentration-dépendante de la mPHP avec  $58.1 \pm 2.5$  % de la mPHP (figure 61). Cette inhibition était réversible quasi totalement après une heure de lavage.



**Figure 61 : Inhibition concentration dépendante de la mAHP par le DTG, d'après (Lamy et al., 2010b).**

Des expériences contrôle en présence, entre autre, d'un antagoniste  $\sigma_1$  (BD 1047 testé jusque 100  $\mu\text{M}$ ) ont été réalisées afin de s'assurer que l'effet observé était bien lié à une action au niveau des  $R\sigma$ . Les divers antagonistes testés ne sont pas parvenus à empêcher l'inhibition de la mPHP, montrant que l'effet ne pouvait pas impliquer les récepteurs  $\sigma$ . Dès lors, nous avons envisagé que ce ligand  $\sigma$  pouvait également interagir directement avec les canaux SK.

## 7.2 Méthode : solutions utilisées

La composition des solutions utilisées est présentée ci-dessous, la méthode des expériences intracellulaires, qui sort du cadre de cette thèse, est détaillée dans la littérature (Lamy et al., 2010b).

Solution intracellulaire (mM) : KCl (127), HEPES (10), BAPTA (10), Na<sub>2</sub>ATP (1.5), CaCl<sub>2</sub> (9.65), MgCl<sub>2</sub> (2.34). La solution est amenée au pH de 7.4 par ~ 40 mM KOH et contient 1μM de Ca<sup>2+</sup> (libre).

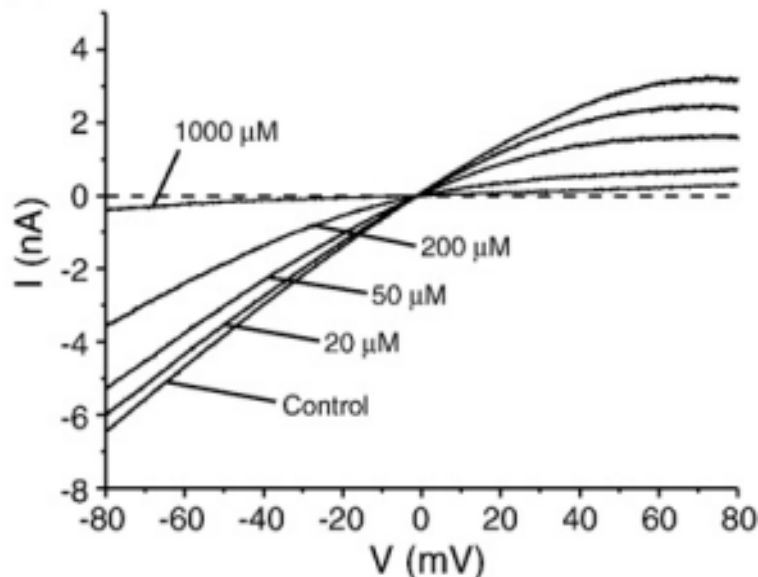
Solution extracellulaire symétrique (mM) : KCl (127), HEPES (10), EGTA (10), CaCl<sub>2</sub> (6.19), MgCl<sub>2</sub> (1.44). La solution est amenée au pH de 7.4 par ~ 40 mM KOH et contient 60 nM de Ca<sup>2+</sup> (libre).

Solution extracellulaire physiologique (mM) : NaCl (110), KCl (5), HEPES (10), EGTA (10), CaCl<sub>2</sub> (6.19), MgCl<sub>2</sub> (1.44), D-glucose (10). La solution est amenée au pH de 7.4 par NaOH.



### 7.3 Le DTG bloque directement les canaux SK

Etant donné que le DTG a été l'unique agoniste  $\sigma$  à bloquer la mPHP et que cet effet n'est pas entravé par des antagonistes  $\sigma$ , nous avons conclu que l'effet ne devait pas impliquer ces récepteurs. L'hypothèse la plus simple était donc que le DTG inhibe la mPHP en bloquant directement les canaux SK. Pour tester cette hypothèse, nous avons appliqué du DTG sur des cellules HEK293 transfectées transitoirement avec les canaux SK2 et SK3 en « patch-clamp » dans le mode voltage contrôlé. Ces expériences ont effectivement montré une inhibition concentration-dépendante du courant SK par le DTG (figure 62).



**Figure 62 : Courants provenant d'une cellule transfectée par SK2 et évoqués par des rampes de voltage allant de -80 à +80 mV dans un milieu symétrique en  $K^+$ . Ces courants sont inhibés de façon concentration dépendante par le DTG.**

Etant donné que les expériences sur coupes ont été réalisées en  $K^+$  physiologique, nous avons également testé le DTG dans ces conditions. En  $K^+$  symétrique, nous avons obtenu des valeurs d' $IC_{50}$  de  $225 \pm 17 \mu M$  ( $n=8$ ) et en  $K^+$  physiologique de  $265 \pm 36 \mu M$  ( $n=9$ ) et  $217 \pm 49 \mu M$  ( $n=8$ ) et  $225 \pm 17 \mu M$  ( $n=8$ ) pour SK2 et SK3 respectivement (figure 63). Aucune différence n'a été détectée par un test de Student ( $P>0.05$ ) entre les  $IC_{50}$  de SK2 et SK3 pour chaque condition. Une ANOVA globale n'a pas non plus détecté de différence entre les quatre groupes ( $P>0.05$ ).

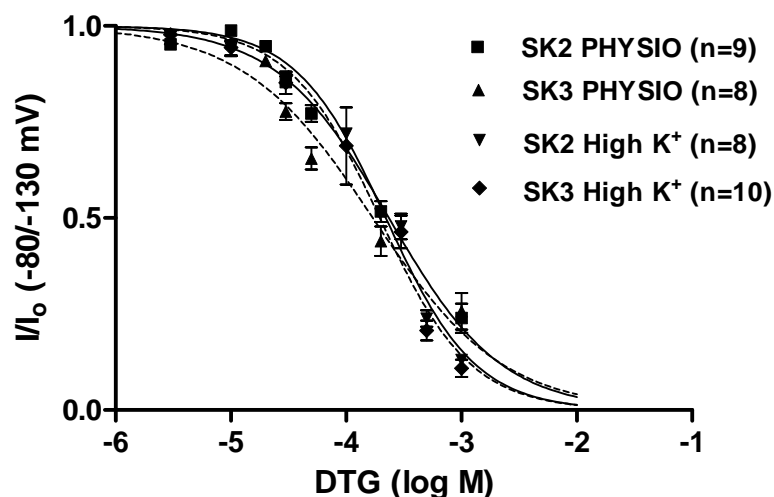


Figure 63 : Courbes concentration-réponse pour le blocage des courants SK2 et SK3 (pointillés) en  $K^+$  élevé (symétrique) et physiologique.

Afin d'écarter l'hypothèse, peu probable, d'un effet sur d'éventuels récepteurs  $\sigma$  endogènes, nous avons réalisé un contrôle en effectuant des courbes concentration-réponse pour SK2 et SK3 en présence d'un antagoniste de ces récepteurs, le BD1047 (Matsumoto et al., 1995). Les cellules ont été incubées pendant au moins 15 minutes avec l'antagoniste avant la réalisation des courbes. Le BD1047 était bien entendu également présent dans la perfusion focale appliquant le DTG. Les  $IC_{50}$  obtenues en présence de l'antagoniste étaient de  $231 \pm 29 \mu M$  ( $n = 3$ ) et de  $212 \pm 25 \mu M$  ( $n = 4$ ) respectivement pour SK2 et SK3. A l'instar des résultats obtenus sur tranches de cerveau, l'inhibition du courant par le DTG sur lignée cellulaire reste inchangée en présence ou non de l'antagoniste (figure 64).

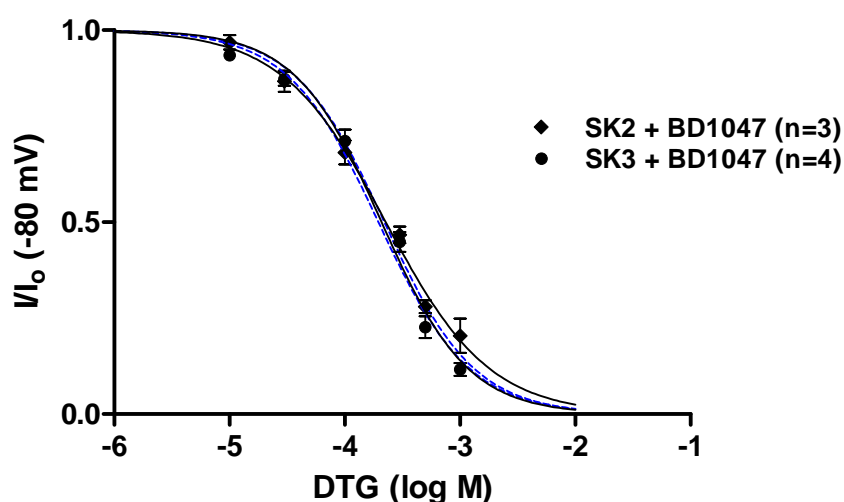


Figure 64 : Courbes d'inhibition du DTG sur lignée cellulaire exprimant SK2 et SK3 en présence d'un antagoniste (noir). Les traces en pointillés illustrent l'effet du DTG en l'absence d'antagoniste.

Cette partie de l'étude sur le DTG nous montre que ce dernier bloque directement les canaux SK. Bien que les concentrations utilisées soient relativement élevées, nous avons démontré que 100  $\mu\text{M}$  de DTG réduisaient de moitié la mPHP. L'utilisation du DTG dans le cadre de l'étude de récepteurs  $\sigma$  neuronaux doit donc tenir compte de l'activité complémentaire de ce produit sur les canaux SK. Par exemple, une étude *in vitro* utilise le DTG à 100  $\mu\text{M}$  sur des neurones corticaux de rat (Herrera et al., 2008), or on retrouve des canaux SK2 dans ces neurones. Le risque d'interférence au niveau des résultats est donc possible lors de l'utilisation de ce composé.

#### 7.4 Etude préliminaire qualitative du site d'interaction potentiel du DTG sur les canaux SK

L'objectif principal de cette thèse étant l'étude des sites d'interactions de ligands SK, nous avons tenté de découvrir le mécanisme d'action du DTG sur les canaux SK. Les expériences de biologie moléculaire de cette partie ont été réalisées à l'Université d'Anvers dans le laboratoire de Biophysique des canaux ioniques du Pr. Dirk Snyders. Notre première démarche a été de comparer le DTG avec le TEA. En effet, nous sommes en présence de deux petites molécules (figure 65) possédant un centre chargé positivement entouré de structures hydrophobes.

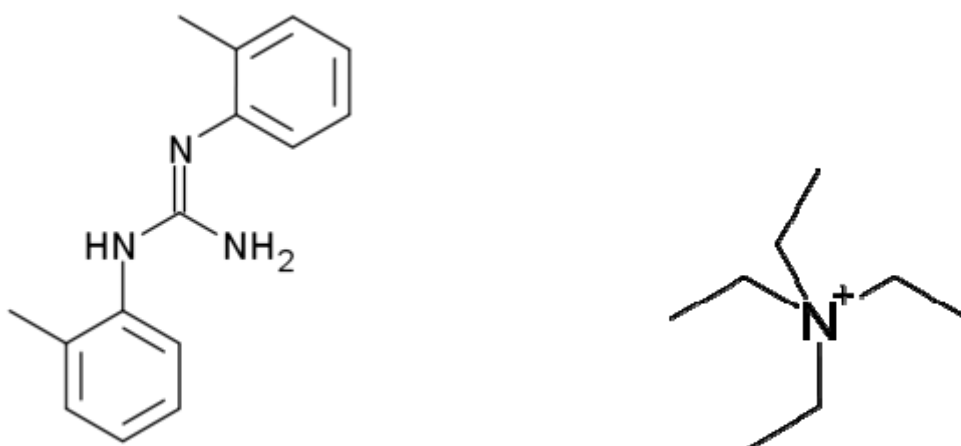


Figure 65 : Structure du DTG (gauche) et du TEA (droite)

## 7.5 Le DTG bloque le mutant insensible à l'apamine

A l'instar du TEA, le DTG bloque le canal insensible à l'apamine SK2H337N avec une  $IC_{50}$  de  $80 \pm 20 \mu\text{M}$ ,  $n = 5$ , ce qui pourrait suggérer qu'il agit comme un bloqueur de pore (figure 66).

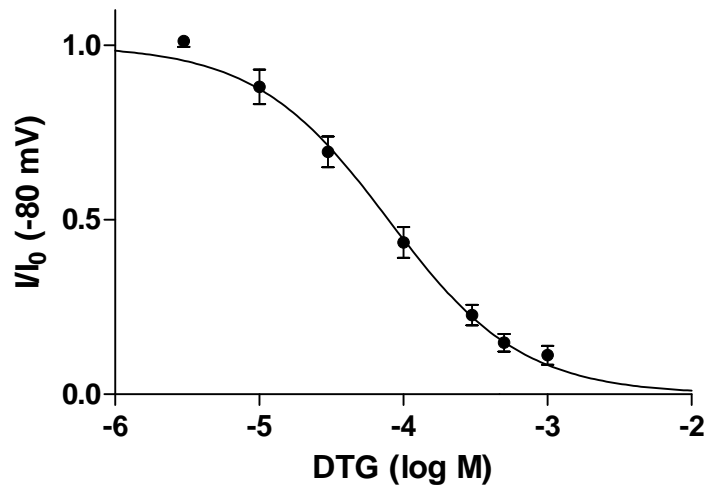


Figure 66 : courbe d'inhibition du DTG sur le mutant insensible à l'apamine (SK2H337N)

Le DTG est en effet suffisamment petit pour pouvoir se loger dans le pore de notre modèle et interagir avec les mêmes acides aminés que le TEA (figure 67).

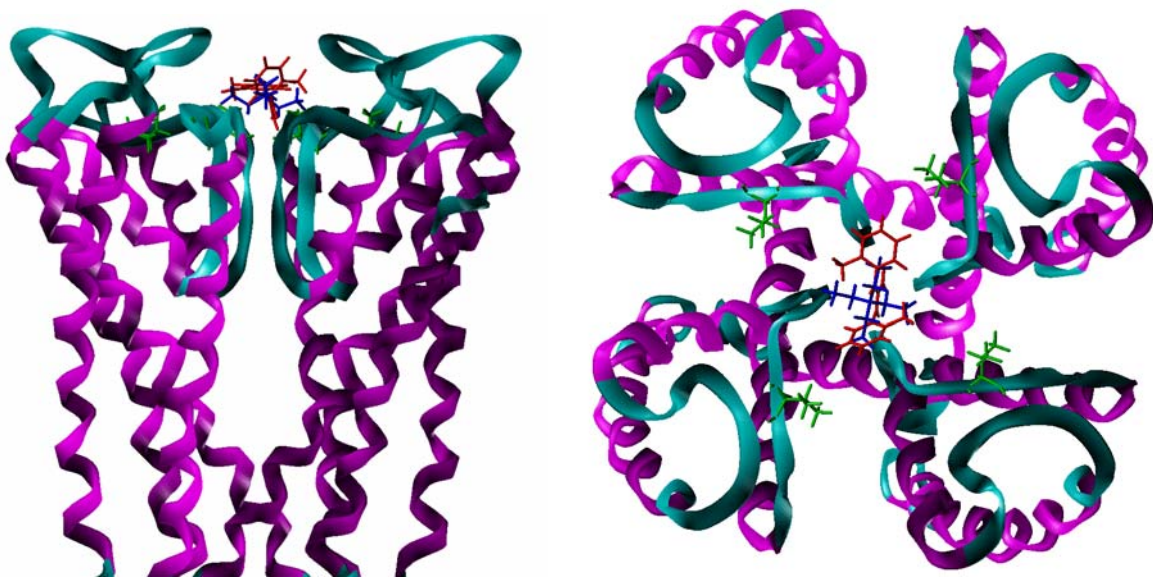


Figure 67 : Résultats d'un docking (S. Dilly) du TEA et du DTG. Les deux molécules forment des liaisons hydrophobes avec des résidus valine juste au-dessus du filtre de sélectivité.

Comme décrit plus haut, nous avons créé un mutant permettant d'augmenter la sensibilité des canaux SK vis-à-vis du TEA. En effet, les fonctions éthyles du TEA forment des liaisons hydrophobes avec une valine du pore formant en quelque sorte une couronne hydrophobe au dessus du pore. Transformer une valine en phénylalanine a donc pour conséquence d'augmenter l'hydrophobicité de cette région et donc d'augmenter la force de la liaison hydrophobe entre le TEA et cette partie. La mutation inverse visant à réduire cette interaction en mutant la valine en alanine n'a, par contre, pas atteint le seuil de significativité pour le TEA.

Etant donné que le TEA et le DTG forment dans notre modèle le même type d'interaction, nous avons testé les mutants SK3V520F et V520A avec le DTG. De plus, la mutation de la valine en phénylalanine permet, d'après notre modèle, de créer une interaction de type cation-pi entre les groupements tolyl du DTG et les phényles de la phénylalanine. Ce type d'interaction est plus favorable qu'une interaction hydrophobe avec une valine. Ces données doivent être considérées comme exploratoires et qualitatives au vu du nombre restreint d'expérience. L' $IC_{50}$  moyenne obtenue pour SK3V520A est de  $\sim 80 \mu\text{M}$  ( $n=2$ ) (figure 68), cette mutation n'a donc visiblement pas altéré drastiquement la capacité du DTG à bloquer les canaux SK.

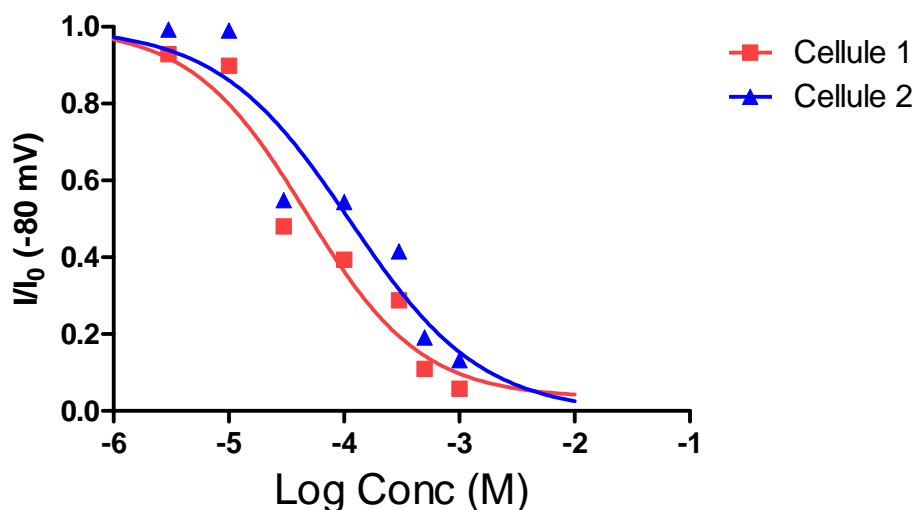
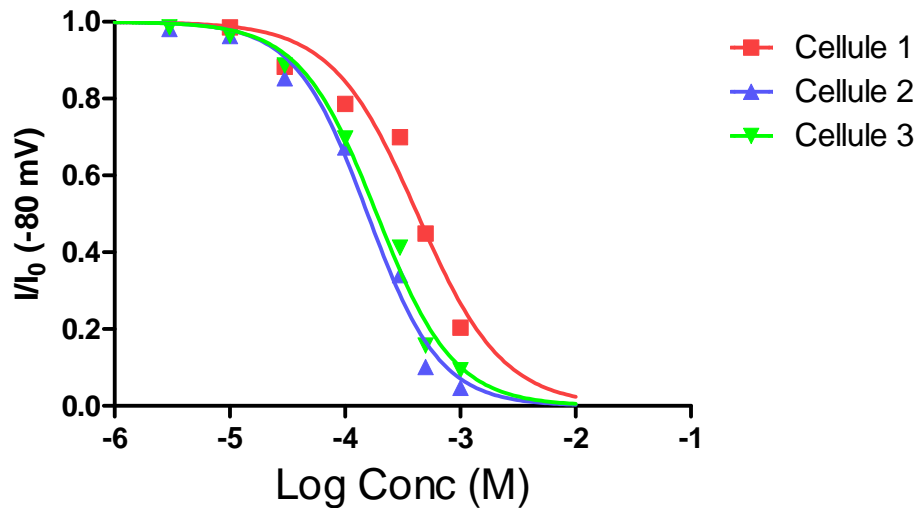


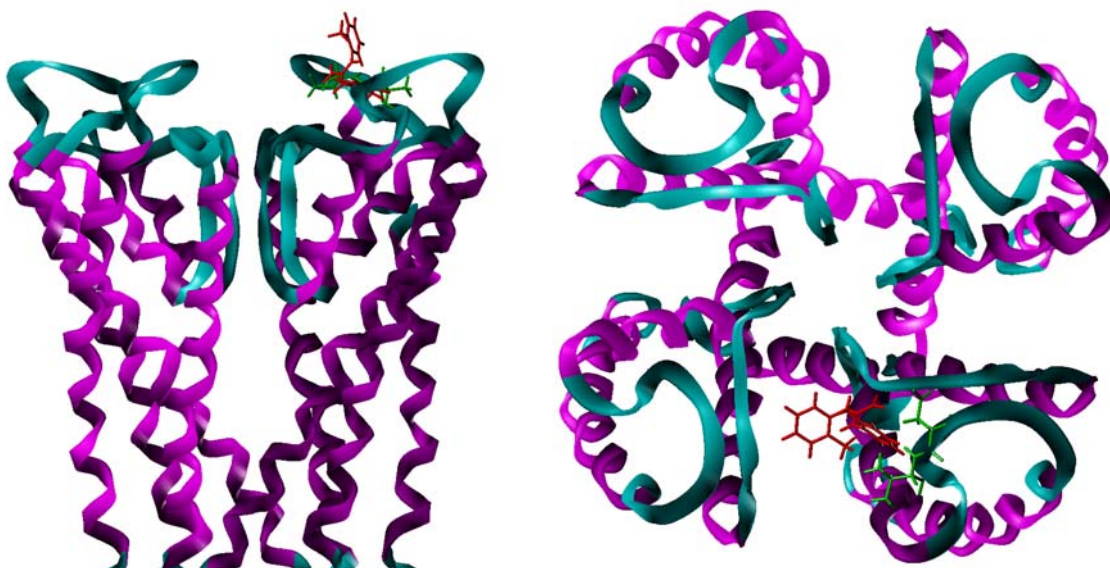
Figure 68 : Courbes concentration-réponse du DTG sur SK3V520A mesurées en voltage-clamp à  $-80 \text{ mV}$  en  $\text{K}^+$  symétrique. La valeur moyenne des  $IC_{50}$  est de  $79 \pm 32 \mu\text{M}$  ( $n=2$ ).

La mutation SK3V520F devrait augmenter sensiblement la puissance du DTG en exacerbant les forces hydrophobes. Cependant, ce n'est pas le cas vu que l' $IC_{50}$  moyenne obtenue est de  $\sim 250 \mu\text{M}$  ( $n=3$ ) (figure 69).



**Figure 69** : Courbes concentration-réponse du DTG sur SK3V520F mesurées en voltage-clamp à -80 mV en  $K^+$  symétrique. La valeur moyenne des  $IC_{50}$  est de  $256 \pm 84 \mu\text{M}$  ( $n=3$ ).

En parallèle, une deuxième série d'expériences de « docking » a identifié un autre site d'interaction potentiel du DTG en détectant une liaison hydrogène avec la D495 et une liaison hydrophobe avec la V496 (pour SK3) (figure 70). Vu la proximité de sites d'interactions mis en évidence pour l'apamine et d'autres bloqueurs, nous avons muté ces positions en alanine, permettant d'annihiler la liaison hydrogène et de fortement réduire la liaison hydrophobe en créant le canal muté SK3D495A/V496A.



**Figure 70** : Résultat de « docking » du DTG identifiant un site d'interaction distal.

Le résultat des expériences s'est malheureusement avéré négatif étant donné que le DTG bloque le courant passant par le canal de ce mutant SK3D495A/V496A avec une  $IC_{50}$  moyenne de  $115 \mu M \pm 32 \mu M$  ( $n=3$ ) (figure 71).

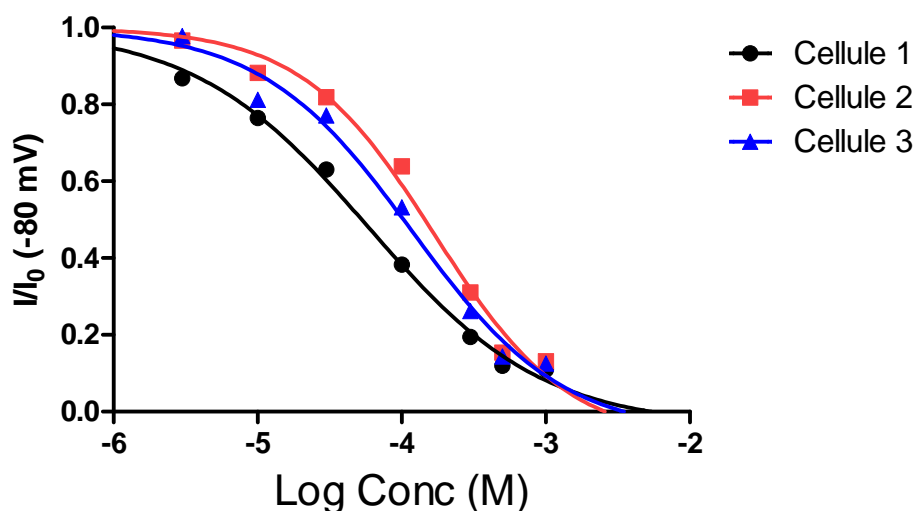


Figure 71 : Courbes concentration-réponse du DTG sur SK3D495A/V496A mesurées à -80 mV en  $K^+$  symétrique.

## 7.6 Discussion

Nous avons identifié deux sites d'interaction théoriques du DTG. Cependant, l'exploration de ces hypothèses par mutagenèse ne nous a pas permis de valider nos théories. Il est clair que notre modèle *in silico* a été mis à rude épreuve en ayant suggéré deux sites de fixation invalidés par nos expériences d'électrophysiologie. Cependant, nous devons relativiser par le fait que le DTG est une petite molécule probablement chargée en permanence. Nous n'avons pas trouvé la valeur expérimentale de pKa du DTG mais le calculateur appelé SPARC (Hilal et al., 2007) permet de donner une estimation du pKa de 9.92, ce qui veut dire que >99% des molécules de DTG sont ionisées à pH 7.4. Notre modélisateur a donc utilisé la version chargée dans toutes ses expériences. Une petite molécule chargée positivement n'a pas uniquement la possibilité de former des liaisons de types ionique (comme une interaction de l'amine quaternaire avec un aspartate ou un glutamate), elle peut également interagir avec des structures aromatiques riches en électrons (phénylalanine, tryptophane, tyrosine). Dans une expérience de « docking », ceci va entraîner la génération d'un nombre important de sites de liaison possibles, et donc un risque élevé de faux positifs.

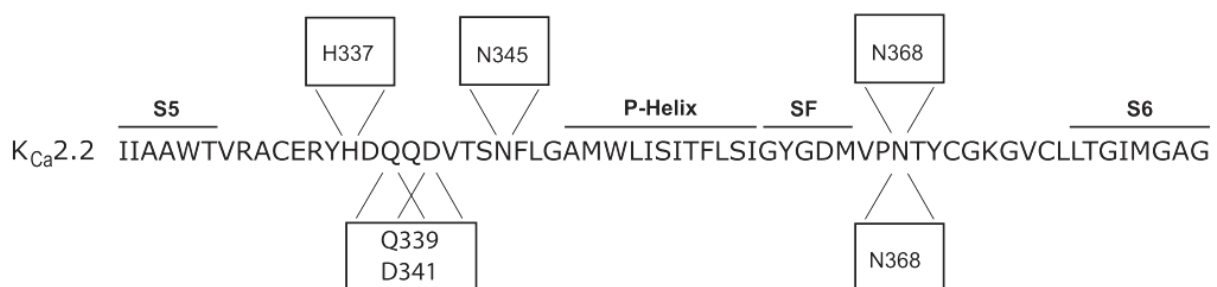
Cependant, ces résultats qui semblent au premier abord négatifs nous apportent quand même un enseignement important. En effet, jusqu'à présent, les molécules testées (apamine, UCL1684, NML, tubocurarine) interagissaient avec un site commun (H337 pour SK2 et H491 pour SK3); seul le TEA se démarque avec son interaction classique de type bloqueur de pore. D'après ces résultats préliminaires, il semble que le DTG agit sur un site différent. En effet, d'une part, il bloque des canaux mutants insensibles à l'apamine et à la NML et, d'autre part, au moins une mutation qui affecte profondément la sensibilité au TEA ne modifie pas son effet. L'essence de ce travail est d'identifier des sites et des mécanismes d'action de bloqueurs afin de modéliser leur interaction et *in fine* générer des molécules *in silico* qui permettraient de discriminer l'un ou l'autre sous-type. Le DTG pourrait agir sur un nouveau site non encore décrit. Cette observation pourrait être intéressante car elle ouvre de nouvelles portes dans le design de molécules sélectives même si son IC<sub>50</sub> relativement élevée n'en fait pas le candidat idéal. Il est en effet impossible de savoir si de nouveaux dérivés pourraient être plus puissants en agissant sur ce site qui reste encore à découvrir.



## 8 Discussion générale

Les différentes études que nous avons effectuées ont permis d'améliorer notre compréhension sur des mécanismes de blocage des canaux SK. Bien que l'inhibition par un pH acide soit un phénomène courant au niveau des canaux potassiques, il est intéressant d'avoir mis en évidence une différence de sensibilité entre SK2 et SK3. Le mécanisme de cette inhibition a été élucidé par des études en « single-channel » qui nous montrent que les protons réduisent la conductance unitaire sans affecter les autres paramètres biophysiques du canal. Le site d'interaction principal des protons s'est avéré être commun avec celui de l'apamine. Un fait important à noter est qu'il s'agit de la première fois que le canal SK3 montré est plus sensible que SK2 face à une inhibition. Cette observation sera, je l'espère, justement exploitée dans de futurs travaux.

L'interaction de l'apamine avec sa cible semblait évidente il y a quelque temps mais s'avère en réalité plus complexe. En effet, une équipe a récemment montré qu'un acide aminé éloigné de la région du pore était impliqué dans le blocage du courant (Nolting et al., 2007). Notre travail a démontré que l'apamine devait effectivement se placer en dehors de la bouche du pore externe (Lamy et al., 2010a). Il existe donc à l'heure actuelle trois travaux principaux décrivant le site d'interaction de l'apamine. Le travail d'Ishii et le nôtre situe le site de liaison de l'apamine dans une zone proche. La séquence de SK2 reprise ci-dessous montre les acides aminés impliqués dans le blocage par l'apamine (figure 72).



**Figure 72 : Séquence du pore externe avec les acides aminés identifiés par Ishii et al ; en bas et ceux de notre travail en haut.**

Ces travaux sont compatibles les uns avec les autres. Cela permet d'espérer que nous nous approchons de la réalité. Nous avons réuni dans ce travail trois mécanismes de blocage différents: le TEA agit comme un bloqueur de pore, l'apamine a un mécanisme de blocage

allostérique et le DTG ne semble pas partager un de ces mécanismes, ou du moins son interaction se situe ailleurs sur le canal.

L'objectif final de ce travail était de progresser dans la compréhension des mécanismes de blocage et dans la biophysique des canaux SK dans le but de créer un hypothétique bloqueur sélectif. Le positionnement de plus en plus précis de l'apamine sur les canaux et un possible nouveau site d'interaction pour le DTG semble montrer qu'une étape supplémentaire a été franchie et que l'effort de recherche dans ce domaine doit se poursuivre pour atteindre son but ultime à savoir la création de bloqueurs sélectifs des sous-types de canaux SK.

## 9 Références

- Ahern, C.A., Eastwood, A.L., Lester, H.A., Dougherty, D.A., Horn, R., 2006. A cation- $\pi$  interaction between extracellular TEA and an aromatic residue in potassium channels. *J Gen Physiol* 128, 649-657.
- Allen, D., Fakler, B., Maylie, J., Adelman, J.P., 2007. Organization and regulation of small conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channel multiprotein complexes. *J Neurosci* 27, 2369-2376.
- Armstrong, C.M., Binstock, L., 1965. Anomalous Rectification in the Squid Giant Axon Injected with Tetraethylammonium Chloride. *J Gen Physiol* 48, 859-872.
- Baker, D., Sali, A., 2001. Protein structure prediction and structural genomics. *Science* 294, 93-96.
- Bastianetto, S., Rouquier, L., Perrault, G., Sanger, D.J., 1995. DTG-induced circling behaviour in rats may involve the interaction between sigma sites and nigro-striatal dopaminergic pathways. *Neuropharmacology* 34, 281-287.
- Bayliss, D.A., Barrett, P.Q., 2008. Emerging roles for two-pore-domain potassium channels and their potential therapeutic impact. *Trends Pharmacol Sci* 29, 566-575.
- Benton, D.C., Monaghan, A.S., Hosseini, R., Bahia, P.K., Haylett, D.G., Moss, G.W., 2003. Small conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels formed by the expression of rat SK1 and SK2 genes in HEK 293 cells. *J Physiol* 553, 13-19.
- Berkefeld, H., Sailer, C.A., Bildl, W., Rohde, V., Thumfart, J.O., Eble, S., Klugbauer, N., Reisinger, E., Bischofberger, J., Oliver, D., Knaus, H.G., Schulte, U., Fakler, B., 2006. BKCa-Cav channel complexes mediate rapid and localized  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  signaling. *Science* 314, 615-620.
- Bezanilla, F., Armstrong, C.M., 1972. Negative conductance caused by entry of sodium and cesium ions into the potassium channels of squid axons. *J Gen Physiol* 60, 588-608.
- Blatz, A.L., Magleby, K.L., 1986. Single apamin-blocked Ca-activated  $\text{K}^{+}$  channels of small conductance in cultured rat skeletal muscle. *Nature* 323, 718-720.
- Bond, C.T., Herson, P.S., Strassmaier, T., Hammond, R., Stackman, R., Maylie, J., Adelman, J.P., 2004. Small conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channel knock-out mice reveal the identity of calcium-dependent afterhyperpolarization currents. *J Neurosci* 24, 5301-5306.
- Bouchard, P., Quirion, R., 1997. [ $^3\text{H}$ ]1,3-di(2-tolyl)guanidine and [ $^3\text{H}$ ](+)pentazocine binding sites in the rat brain: autoradiographic visualization of the putative sigma1 and sigma2 receptor subtypes. *Neuroscience* 76, 467-477.
- Bradding, P., Wulff, H., 2009. The  $\text{K}^{+}$  channels  $\text{K}(\text{Ca})3.1$  and  $\text{K}(\text{v})1.3$  as novel targets for asthma therapy. *Br J Pharmacol* 157, 1330-1339.
- Bruening-Wright, A., Lee, W.S., Adelman, J.P., Maylie, J., 2007. Evidence for a deep pore activation gate in small conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels. *J Gen Physiol* 130, 601-610.

- Bystrov, V.F., Okhanov, V.V., Miroshnikov, A.I., Ovchinnikov, Y.A., 1980. Solution spatial structure of apamin as derived from NMR study. *FEBS Lett* 119, 113-117.
- Castle, N.A., London, D.O., Creech, C., Fajloun, Z., Stocker, J.W., Sabatier, J.M., 2003. Maurotoxin: a potent inhibitor of intermediate conductance  $Ca^{2+}$ -activated potassium channels. *Mol Pharmacol* 63, 409-418.
- Chang, D., Kushman, N.L., Dawson, D.C., 1991. Intracellular pH regulates basolateral  $K^{+}$  and  $Cl^{-}$  conductances in colonic epithelial cells by modulating  $Ca^{2+}$  activation. *J Gen Physiol* 98, 183-196.
- Choe, S., 2002. Potassium channel structures. *Nat Rev Neurosci* 3, 115-121.
- Clay, J.R., 2009. Determining  $k$  channel activation curves from  $k$  channel currents often requires the goldman-hodgkin-katz equation. *Front Cell Neurosci* 3, 20.
- Claydon, T.W., Boyett, M.R., Sivaprasadarao, A., Ishii, K., Owen, J.M., O'Beirne, H.A., Leach, R., Komukai, K., Orchard, C.H., 2000. Inhibition of the  $K^{+}$  channel  $kv1.4$  by acidosis: protonation of an extracellular histidine slows the recovery from N-type inactivation. *J Physiol* 526 Pt 2, 253-264.
- Cohen, A., Ben-Abu, Y., Hen, S., Zilberberg, N., 2008. A novel mechanism for human  $K2P2.1$  channel gating: facilitation of C-type gating by protonation of extra cellular histidine residues. *J Biol Chem*.
- Collingridge, G.L., Isaac, J.T., Wang, Y.T., 2004. Receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 5, 952-962.
- Cook, N.S., Haylett, D.G., 1985. Effects of apamin, quinine and neuromuscular blockers on calcium-activated potassium channels in guinea-pig hepatocytes. *J Physiol* 358, 373-394.
- Coulter, K.L., Perier, F., Radeke, C.M., Vandenberg, C.A., 1995. Identification and molecular localization of a pH-sensing domain for the inward rectifier potassium channel HIR. *Neuron* 15, 1157-1168.
- Cui, J., Yang, H., Lee, U.S., 2009. Molecular mechanisms of BK channel activation. *Cell Mol Life Sci* 66, 852-875.
- Dale, T.J., Cryan, J.E., Chen, M.X., Trezise, D.J., 2002. Partial apamin sensitivity of human small conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  channels stably expressed in Chinese hamster ovary cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 366, 470-477.
- Dilly, S., Graulich, A., Farce, A., Seutin, V., Liegeois, J.F., Chavatte, P., 2005. Identification of a pharmacophore of SKCa channel blockers. *J Enzyme Inhib Med Chem* 20, 517-523.
- Doyle, D.A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T., MacKinnon, R., 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of  $K^{+}$  conduction and selectivity. *Science* 280, 69-77.
- Dreixler, J.C., Bian, J., Cao, Y., Roberts, M.T., Roizen, J.D., Houamed, K.M., 2000. Block of rat brain recombinant SK channels by tricyclic antidepressants and related compounds. *Eur J Pharmacol* 401, 1-7.

- Faber, E.S., Sah, P., 2007. Functions of SK channels in central neurons. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34, 1077-1083.
- Fanger, C.M., Ghanshani, S., Logsdon, N.J., Rauer, H., Kalman, K., Zhou, J., Beckingham, K., Chandy, K.G., Cahalan, M.D., Aiyar, J., 1999. Calmodulin mediates calcium-dependent activation of the intermediate conductance KCa channel, IKCa1. *J Biol Chem* 274, 5746-5754.
- Fedida, D., Zhang, S., Kwan, D.C., Eduljee, C., Kehl, S.J., 2005. Synergistic inhibition of the maximum conductance of Kv1.5 channels by extracellular K<sup>+</sup> reduction and acidification. *Cell Biochem Biophys* 43, 231-242.
- Friedman, H.L., Krishnan, C.V., Jolicoeur, C., 1973. Ionic interactions in water. *Ann N Y Acad Sci* 204, 78-99.
- Galanakis, D., Ganellin, C.R., Malik, S., Dunn, P.M., 1996. Synthesis and pharmacological testing of dequalinium analogues as blockers of the apamin-sensitive Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channel: variation of the length of the alkylene chain. *J Med Chem* 39, 3592-3595.
- Gao, Y., Chotoo, C.K., Balut, C.M., Sun, F., Bailey, M.A., Devor, D.C., 2008. Role of S3 and S4 Transmembrane Domain Charged Amino Acids in Channel Biogenesis and Gating of KCa2.3 and KCa3.1. *J Biol Chem* 283, 9049-9059.
- Garneau, L., Klein, H., Banderali, U., Longpre-Lauzon, A., Parent, L., Sauve, R., 2009. Hydrophobic interactions as key determinants to the KCa3.1 channel closed configuration. An analysis of KCa3.1 mutants constitutively active in zero Ca<sup>2+</sup>. *J Biol Chem* 284, 389-403.
- Geiger, D., Becker, D., Lacombe, B., Hedrich, R., 2002. Outer pore residues control the H(+) and K(+) sensitivity of the Arabidopsis potassium channel AKT3. *Plant Cell* 14, 1859-1868.
- Ghatta, S., Nimmagadda, D., Xu, X., O'Rourke, S.T., 2006. Large-conductance, calcium-activated potassium channels: structural and functional implications. *Pharmacol Ther* 110, 103-116.
- Gong, X., Li, J., Xu, K., Wang, J., Yang, H., 2010. A controllable molecular sieve for Na(+) and K(+) ions. *J Am Chem Soc* 132, 1873-1877.
- Gonzalez, G.M., Werling, L.L., 1997. Release of [3H]dopamine from guinea pig striatal slices is modulated by sigma1 receptor agonists. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 356, 455-461.
- Goodchild, S.J., Lamy, C., Seutin, V., Marrion, N.V., 2009. Inhibition of K(Ca)2.2 and K(Ca)2.3 channel currents by protonation of outer pore histidine residues. *J Gen Physiol* 134, 295-308.
- Gotoh, H., Kajikawa, M., Kato, H., Suto, K., 1999. Intracellular Mg<sup>2+</sup> surge follows Ca<sup>2+</sup> increase during depolarization in cultured neurons. *Brain Res* 828, 163-168.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., Nairn, R., 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36, 59-74.

Graulich, A., Lamy, C., Alleva, L., Dilly, S., Chavatte, P., Wouters, J., Seutin, V., Liegeois, J.F., 2008. Bis-tetrahydroisoquinoline derivatives: AG525E1, a new step in the search for non-quaternary non-peptidic small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel blockers. *Bioorg Med Chem Lett* 18, 3440-3445.

Graulich, A., Scuvee-Moreau, J., Seutin, V., Liegeois, J.F., 2005. Synthesis and radioligand binding studies of C-5- and C-8-substituted 1-(3,4-dimethoxybenzyl)-2,2-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoliniums as SK channel blockers related to N-methyl-laudoanidine and N-methyl-noscapine. *J Med Chem* 48, 4972-4982.

Grunnet, M., Jensen, B.S., Olesen, S.P., Klaerke, D.A., 2001a. Apamin interacts with all subtypes of cloned small-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. *Pflugers Arch* 441, 544-550.

Grunnet, M., Jespersen, T., Angelo, K., Frokjaer-Jensen, C., Klaerke, D.A., Olesen, S.P., Jensen, B.S., 2001b. Pharmacological modulation of SK3 channels. *Neuropharmacology* 40, 879-887.

Gu, N., Vervaeke, K., Hu, H., Storm, J.F., 2005. Kv7/KCNQ/M and HCN/h, but not KCa<sub>2</sub>/SK channels, contribute to the somatic medium after-hyperpolarization and excitability control in CA1 hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* 566, 689-715.

Habermann, E., Reiz, K.G., 1965. [On the biochemistry of bee venom peptides, melittin and apamin]. *Biochem Z* 343, 192-203.

Heginbotham, L., MacKinnon, R., 1992. The aromatic binding site for tetraethylammonium ion on potassium channels. *Neuron* 8, 483-491.

Herrera, Y., Katnik, C., Rodriguez, J.D., Hall, A.A., Willing, A., Pennypacker, K.R., Cuevas, J., 2008. sigma-1 receptor modulation of acid-sensing ion channel  $\alpha$  (ASIC1a) and ASIC1a-induced Ca<sup>2+</sup> influx in rat cortical neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 327, 491-502.

Hilal, S.H., Saravananaraj, A.N., Whiteside, T., Carreira, L.A., 2007. Calculating physical properties of organic compounds for environmental modeling from molecular structure. *J Comput Aided Mol Des* 21, 693-708.

Hille, B., 2001. *Ion Channels of Excitable Membranes*. Sinauer Associates, Sunderland.

Hosseini, R., Benton, D.C., Dunn, P.M., Jenkinson, D.H., Moss, G.W., 2001. SK3 is an important component of K<sup>+</sup> channels mediating the afterhyperpolarization in cultured rat SCG neurones. *J Physiol* 535, 323-334.

Hougaard, C., Eriksen, B.L., Jorgensen, S., Johansen, T.H., Dyhring, T., Madsen, L.S., Strobaek, D., Christophersen, P., 2007. Selective positive modulation of the SK3 and SK2 subtypes of small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. *Br J Pharmacol* 151, 655-665.

Hougaard, C., Jensen, M.L., Dale, T.J., Miller, D.D., Davies, D.J., Eriksen, B.L., Strobaek, D., Trezise, D.J., Christophersen, P., 2009. Selective activation of the SK1 subtype of human small-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels by 4-(2-methoxyphenylcarbamoyloxymethyl)-piperidine-1-carboxylic acid tert-butyl ester (GW542573X) is dependent on serine 293 in the S5 segment. *Mol Pharmacol* 76, 569-578.

- Hugues, M., Duval, D., Kitabgi, P., Lazdunski, M., Vincent, J.P., 1982a. Preparation of a pure monoiodo derivative of the bee venom neurotoxin apamin and its binding properties to rat brain synaptosomes. *J Biol Chem* 257, 2762-2769.
- Hugues, M., Duval, D., Schmid, H., Kitabgi, P., Lazdunski, M., Vincent, J.P., 1982b. Specific binding and pharmacological interactions of apamin, the neurotoxin from bee venom, with guinea pig colon. *Life Sci* 31, 437-443.
- Ishii, T.M., Maylie, J., Adelman, J.P., 1997b. Determinants of apamin and d-tubocurarine block in SK potassium channels. *J Biol Chem* 272, 23195-23200.
- Ishii, T.M., Silvia, C., Hirschberg, B., Bond, C.T., Adelman, J.P., Maylie, J., 1997. A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11651-11656.
- Jager, H., Grissmer, S., 2004. Characterization of the outer pore region of the apamin-sensitive Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel rSK2. *Toxicon* 43, 951-960.
- Jensen, B.S., Strobaek, D., Olesen, S.P., Christophersen, P., 2001. The Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel of intermediate conductance: a molecular target for novel treatments? *Curr Drug Targets* 2, 401-422.
- Jiang, Y., MacKinnon, R., 2000. The barium site in a potassium channel by x-ray crystallography. *J Gen Physiol* 115, 269-272.
- Jonas, E.A., Kaczmarek, L.K., 1996. Regulation of potassium channels by protein kinases. *Curr Opin Neurobiol* 6, 318-323.
- Keen, J.E., Khawaled, R., Farrens, D.L., Neelands, T., Rivard, A., Bond, C.T., Janowsky, A., Fakler, B., Adelman, J.P., Maylie, J., 1999. Domains responsible for constitutive and Ca(2+)-dependent interactions between calmodulin and small conductance Ca(2+)-activated potassium channels. *J Neurosci* 19, 8830-8838.
- Kehl, S.J., Eduljee, C., Kwan, D.C., Zhang, S., Fedida, D., 2002. Molecular determinants of the inhibition of human Kv1.5 potassium currents by external protons and Zn(2+). *J Physiol* 541, 9-24.
- Khawaled, R., Bruening-Wright, A., Adelman, J.P., Maylie, J., 1999. Bicuculline block of small-conductance calcium-activated potassium channels. *Pflugers Arch* 438, 314-321.
- Kohler, M., Hirschberg, B., Bond, C.T., Kinzie, J.M., Marrion, N.V., Maylie, J., Adelman, J.P., 1996. Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. *Science* 273, 1709-1714.
- Kwan, D.C., Fedida, D., Kehl, S.J., 2006. Single channel analysis reveals different modes of Kv1.5 gating behavior regulated by changes of external pH. *Biophys J* 90, 1212-1222.
- Labbe-Jullie, C., Granier, C., Albericio, F., Defendini, M.L., Ceard, B., Rochat, H., Van Rietschoten, J., 1991. Binding and toxicity of apamin. Characterization of the active site. *Eur J Biochem* 196, 639-645.

- Lamy, C., Goodchild, S.J., Weatherall, K.L., Jane, D.E., Liegeois, J.F., Seutin, V., Marrion, N.V., 2010a. Allosteric block of KCa<sub>2</sub> channels by apamin. *J Biol Chem*.
- Lamy, C., Scuvee-Moreau, J., Dilly, S., Liegeois, J.F., Seutin, V., 2010b. The sigma agonist 1,3-di-o-tolyl-guanidine directly blocks SK channels in dopaminergic neurons and in cell lines. *Eur J Pharmacol* 641, 23-28.
- Lenaeus, M.J., Vamvouka, M., Focia, P.J., Gross, A., 2005. Structural basis of TEA blockade in a model potassium channel. *Nat Struct Mol Biol* 12, 454-459.
- Livingstone, C.D., Barton, G.J., 1993. Protein sequence alignments: a strategy for the hierarchical analysis of residue conservation. *Comput Appl Biosci* 9, 745-756.
- Loane, D.J., Lima, P.A., Marrion, N.V., 2007. Co-assembly of N-type Ca<sup>2+</sup> and BK channels underlies functional coupling in rat brain. *J Cell Sci* 120, 985-995.
- Long, S.B., Campbell, E.B., Mackinnon, R., 2005a. Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K<sup>+</sup> channel. *Science* 309, 897-903.
- Long, S.B., Campbell, E.B., Mackinnon, R., 2005b. Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science* 309, 903-908.
- Lotshaw, D.P., 2007. Biophysical, pharmacological, and functional characteristics of cloned and native mammalian two-pore domain K<sup>+</sup> channels. *Cell Biochem Biophys* 47, 209-256.
- MacKinnon, R., 2003. Potassium channels. *FEBS Lett* 555, 62-65.
- Marqueze, B., Seagar, M.J., Couraud, F., 1987. Photoaffinity labeling of the K<sup>+</sup>-channel-associated apamin-binding molecule in smooth muscle, liver and heart membranes. *Eur J Biochem* 169, 295-298.
- Martina, M., Turcotte, M.E., Halman, S., Bergeron, R., 2007. The sigma-1 receptor modulates NMDA receptor synaptic transmission and plasticity via SK channels in rat hippocampus. *J Physiol* 578, 143-157.
- Matsumoto, R.R., Bowen, W.D., Tom, M.A., Vo, V.N., Truong, D.D., De Costa, B.R., 1995. Characterization of two novel sigma receptor ligands: antidystonic effects in rats suggest sigma receptor antagonism. *Eur J Pharmacol* 280, 301-310.
- Minabe, Y., Matsuno, K., Ashby, C.R., Jr., 1999. Acute and chronic administration of the selective sigma<sub>1</sub> receptor agonist SA4503 significantly alters the activity of midbrain dopamine neurons in rats: An in vivo electrophysiological study. *Synapse* 33, 129-140.
- Moison, D., De Deurwaerdere, P., Cagnotto, A., Marrazzo, A., Prezzavento, O., Ronsisvalle, G., Mennini, T., Spampinato, U., 2003. Intrastratial administration of sigma ligands inhibits basal dopamine release in vivo. *Neuropharmacology* 45, 945-953.
- Monaghan, A.S., Benton, D.C., Bahia, P.K., Hosseini, R., Shah, Y.A., Haylett, D.G., Moss, G.W., 2004. The SK3 subunit of small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels interacts with both SK1 and SK2 subunits in a heterologous expression system. *J Biol Chem* 279, 1003-1009.



- Motulsky, H.J., Brown, R.E., 2006. Detecting outliers when fitting data with nonlinear regression - a new method based on robust nonlinear regression and the false discovery rate. *BMC Bioinformatics* 7, 123.
- Mullins, L.J., 1959. The penetration of some cations into muscle. *J Gen Physiol* 42, 817-829.
- Ngo-Anh, T.J., Bloodgood, B.L., Lin, M., Sabatini, B.L., Maylie, J., Adelman, J.P., 2005. SK channels and NMDA receptors form a Ca<sup>2+</sup>-mediated feedback loop in dendritic spines. *Nat Neurosci* 8, 642-649.
- Nolting, A., Ferraro, T., D'Hoedt, D., Stocker, M., 2007. An amino acid outside the pore region influences apamin sensitivity in small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. *J Biol Chem* 282, 3478-3486.
- Noskov, S.Y., Berneche, S., Roux, B., 2004. Control of ion selectivity in potassium channels by electrostatic and dynamic properties of carbonyl ligands. *Nature* 431, 830-834.
- Noskov, S.Y., Roux, B., 2006. Ion selectivity in potassium channels. *Biophys Chem* 124, 279-291.
- Noskov, S.Y., Roux, B., 2007. Importance of hydration and dynamics on the selectivity of the KcsA and NaK channels. *J Gen Physiol* 129, 135-143.
- Park, Y.B., 1994. Ion selectivity and gating of small conductance Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channels in cultured rat adrenal chromaffin cells. *J Physiol* 481 ( Pt 3), 555-570.
- Pease, J.H., Wemmer, D.E., 1988. Solution structure of apamin determined by nuclear magnetic resonance and distance geometry. *Biochemistry* 27, 8491-8498.
- Pedarzani, P., D'Hoedt, D., Doorty, K.B., Wadsworth, J.D., Joseph, J.S., Jeyaseelan, K., Kini, R.M., Gadre, S.V., Sapatnekar, S.M., Stocker, M., Strong, P.N., 2002. Tamapin, a venom peptide from the Indian red scorpion (*Mesobuthus tamulus*) that targets small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels and afterhyperpolarization currents in central neurons. *J Biol Chem* 277, 46101-46109.
- Pedarzani, P., Kulik, A., Muller, M., Ballanyi, K., Stocker, M., 2000. Molecular determinants of Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channel function in rat dorsal vagal neurones. *J Physiol* 527 Pt 2, 283-290.
- Pedarzani, P., Stocker, M., 2008. Molecular and cellular basis of small--and intermediate-conductance, calcium-activated potassium channel function in the brain. *Cell Mol Life Sci* 65, 3196-3217.
- Peitersen, T., Hougaard, C., Jespersen, T., Jorgensen, N.K., Olesen, S.P., Grunnet, M., 2006. Subtype-specific, bi-component inhibition of SK channels by low internal pH. *Biochem Biophys Res Commun* 343, 943-949.
- Peters, H.C., Hu, H., Pongs, O., Storm, J.F., Isbrandt, D., 2005. Conditional transgenic suppression of M channels in mouse brain reveals functions in neuronal excitability, resonance and behavior. *Nat Neurosci* 8, 51-60.

- Prole, D.L., Lima, P.A., Marrion, N.V., 2003. Mechanisms underlying modulation of neuronal KCNQ2/KCNQ3 potassium channels by extracellular protons. *J Gen Physiol* 122, 775-793.
- Rauer, H., Lanigan, M.D., Pennington, M.W., Aiyar, J., Ghanshani, S., Cahalan, M.D., Norton, R.S., Chandy, K.G., 2000. Structure-guided transformation of charybdotoxin yields an analog that selectively targets Ca(2+)-activated over voltage-gated K(+) channels. *J Biol Chem* 275, 1201-1208.
- Ren, Y., Barnwell, L.F., Alexander, J.C., Lubin, F.D., Adelman, J.P., Pfaffinger, P.J., Schrader, L.A., Anderson, A.E., 2006. Regulation of surface localization of the small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channel, Sk2, through direct phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 281, 11769-11779.
- Ro, S., Hatton, W.J., Koh, S.D., Horowitz, B., 2001. Molecular properties of small-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels expressed in murine colonic smooth muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281, G964-973.
- Rouchet, N., Waroux, O., Lamy, C., Massotte, L., Scuvee-Moreau, J., Liegeois, J.F., Seutin, V., 2008. SK channel blockade promotes burst firing in dorsal raphe serotonergic neurons. *Eur J Neurosci* 28, 1108-1115.
- Sabatier, J.M., Fremont, V., Mabrouk, K., Crest, M., Darbon, H., Rochat, H., Van Rietschoten, J., Martin-Eauclaire, M.F., 1994. Leiurotoxin I, a scorpion toxin specific for Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channels. Structure-activity analysis using synthetic analogs. *Int J Pept Protein Res* 43, 486-495.
- Sabatier, J.M., Zerrouk, H., Darbon, H., Mabrouk, K., Benslimane, A., Rochat, H., Martin-Eauclaire, M.F., Van Rietschoten, J., 1993. P05, a new leiurotoxin I-like scorpion toxin: synthesis and structure-activity relationships of the alpha-amidated analog, a ligand of Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channels with increased affinity. *Biochemistry* 32, 2763-2770.
- Sailer, C.A., Hu, H., Kaufmann, W.A., Trieb, M., Schwarzer, C., Storm, J.F., Knaus, H.G., 2002. Regional differences in distribution and functional expression of small-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in rat brain. *J Neurosci* 22, 9698-9707.
- Sailer, C.A., Kaufmann, W.A., Marksteiner, J., Knaus, H.G., 2004. Comparative immunohistochemical distribution of three small-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channel subunits, SK1, SK2, and SK3 in mouse brain. *Mol Cell Neurosci* 26, 458-469.
- Savic, N., Pedarzani, P., Sciancalepore, M., 2001. Medium afterhyperpolarization and firing pattern modulation in interneurons of stratum radiatum in the CA3 hippocampal region. *J Neurophysiol* 85, 1986-1997.
- Schumacher, M.A., Rivard, A.F., Bachinger, H.P., Adelman, J.P., 2001. Structure of the gating domain of a Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel complexed with Ca<sup>2+</sup>/calmodulin. *Nature* 410, 1120-1124.
- Scuvee-Moreau, J., Liegeois, J.F., Massotte, L., Seutin, V., 2002. Methyl-laundanosine: a new pharmacological tool to investigate the function of small-conductance Ca(2+)-activated K(+) channels. *J Pharmacol Exp Ther* 302, 1176-1183.

- Seeböhm, G., Lerche, C., Busch, A.E., Bachmann, A., 2001. Dependence of I(Ks) biophysical properties on the expression system. *Pflügers Arch* 442, 891-895.
- Shah, M., Haylett, D.G., 2000. The pharmacology of hSK1 Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels expressed in mammalian cell lines. *Br J Pharmacol* 129, 627-630.
- Shakkottai, V.G., Regaya, I., Wulff, H., Fajloun, Z., Tomita, H., Fathallah, M., Cahalan, M.D., Gargus, J.J., Sabatier, J.M., Chandy, K.G., 2001. Design and characterization of a highly selective peptide inhibitor of the small conductance calcium-activated K<sup>+</sup> channel, SkCa2. *J Biol Chem* 276, 43145-43151.
- Shao, Q., Zhou, J., Lu, L., Lu, X., Zhu, Y., Jiang, S., 2009. Anomalous hydration shell order of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> inside carbon nanotubes. *Nano Lett* 9, 989-994.
- Shin, N., Soh, H., Chang, S., Kim do, H., Park, C.S., 2005. Sodium permeability of a cloned small-conductance calcium-activated potassium channel. *Biophys J* 89, 3111-3119.
- Soh, H., Park, C.S., 2001. Inwardly rectifying current-voltage relationship of small-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels rendered by intracellular divalent cation blockade. *Biophys J* 80, 2207-2215.
- Soh, H., Park, C.S., 2002. Localization of divalent cation-binding site in the pore of a small conductance Ca(2+)-activated K(+) channel and its role in determining current-voltage relationship. *Biophys J* 83, 2528-2538.
- Sorensen, U.S., Strobaek, D., Christophersen, P., Hougaard, C., Jensen, M.L., Nielsen, E.O., Peters, D., Teuber, L., 2008a. Synthesis and Structure-Activity Relationship Studies of 2-(N-Substituted)-aminobenzimidazoles as Potent Negative Gating Modulators of Small Conductance Ca(2+)-Activated K(+) Channels. *J Med Chem*.
- Sorensen, U.S., Strobaek, D., Christophersen, P., Hougaard, C., Jensen, M.L., Nielsen, E.O., Peters, D., Teuber, L., 2008b. Synthesis and structure-activity relationship studies of 2-(N-substituted)-aminobenzimidazoles as potent negative gating modulators of small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. *J Med Chem* 51, 7625-7634.
- Steidl, J.V., Yool, A.J., 1999. Differential sensitivity of voltage-gated potassium channels Kv1.5 and Kv1.2 to acidic pH and molecular identification of pH sensor. *Mol Pharmacol* 55, 812-820.
- Stocker, M., Krause, M., Pedarzani, P., 1999. An apamin-sensitive Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> current in hippocampal pyramidal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4662-4667.
- Stocker, M., Pedarzani, P., 2000. Differential distribution of three Ca(2+)-activated K(+) channel subunits, SK1, SK2, and SK3, in the adult rat central nervous system. *Mol Cell Neurosci* 15, 476-493.
- Storm, J.F., 1987. Action potential repolarization and a fast after-hyperpolarization in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* 385, 733-759.
- Strobaek, D., Hougaard, C., Johansen, T.H., Sorensen, U.S., Nielsen, E.O., Nielsen, K.S., Taylor, R.D., Pedarzani, P., Christophersen, P., 2006. Inhibitory Gating Modulation of Small Conductance Ca<sup>2+</sup>-Activated K<sup>+</sup> Channels by the Synthetic Compound (R)-N-

(Benzimidazol-2-yl)-1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthylamine (NS8593) Reduces Afterhyperpolarizing Current in Hippocampal CA1 Neurons. *Mol Pharmacol* 70, 1771-1782.

Strobaek, D., Jorgensen, T.D., Christophersen, P., Ahring, P.K., Olesen, S.P., 2000. Pharmacological characterization of small-conductance Ca(2+)-activated K(+) channels stably expressed in HEK 293 cells. *Br J Pharmacol* 129, 991-999.

Strobaek, D., Teuber, L., Jorgensen, T.D., Ahring, P.K., Kjaer, K., Hansen, R.S., Olesen, S.P., Christophersen, P., Skaaning-Jensen, B., 2004. Activation of human IK and SK Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels by NS309 (6,7-dichloro-1H-indole-2,3-dione 3-oxime). *Biochim Biophys Acta* 1665, 1-5.

Terstappen, G.C., Pellacani, A., Aldegheri, L., Graziani, F., Carignani, C., Pula, G., Virginio, C., 2003. The antidepressant fluoxetine blocks the human small conductance calcium-activated potassium channels SK1, SK2 and SK3. *Neurosci Lett* 346, 85-88.

Terstappen, G.C., Pula, G., Carignani, C., Chen, M.X., Roncarati, R., 2001. Pharmacological characterisation of the human small conductance calcium-activated potassium channel hSK3 reveals sensitivity to tricyclic antidepressants and antipsychotic phenothiazines. *Neuropharmacology* 40, 772-783.

Tsien, R.Y., 1980. New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry* 19, 2396-2404.

Tzingounis, A.V., Nicoll, R.A., 2008. Contribution of KCNQ2 and KCNQ3 to the medium and slow afterhyperpolarization currents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 19974-19979.

Ureche, O.N., Baltaev, R., Ureche, L., Strutz-Seeböhm, N., Lang, F., Seeböhm, G., 2008. Novel insights into the structural basis of pH-sensitivity in inward rectifier K<sup>+</sup> channels Kir2.3. *Cell Physiol Biochem* 21, 347-356.

Valiyaveetil, F.I., Leonetti, M., Muir, T.W., Mackinnon, R., 2006. Ion selectivity in a semisynthetic K<sup>+</sup> channel locked in the conductive conformation. *Science* 314, 1004-1007.

Varghese, A., Tenbroek, E.M., Coles, J., Jr., Sigg, D.C., 2006. Endogenous channels in HEK cells and potential roles in HCN ionic current measurements. *Prog Biophys Mol Biol* 90, 26-37.

Vergara, C., Latorre, R., Marrion, N.V., Adelman, J.P., 1998. Calcium-activated potassium channels. *Curr Opin Neurobiol* 8, 321-329.

Villalobos, C., Shakkottai, V.G., Chandy, K.G., Michelhaugh, S.K., Andrade, R., 2004. SKCa channels mediate the medium but not the slow calcium-activated afterhyperpolarization in cortical neurons. *J Neurosci* 24, 3537-3542.

Vincent, J.P., Schweitz, H., Lazdunski, M., 1975. Structure-function relationships and site of action of apamin, a neurotoxic polypeptide of bee venom with an action on the central nervous system. *Biochemistry* 14, 2521-2525.

Vogalis, F., Storm, J.F., Lancaster, B., 2003. SK channels and the varieties of slow afterhyperpolarizations in neurons. *Eur J Neurosci* 18, 3155-3166.

- Waroux, O., Massotte, L., Alleva, L., Graulich, A., Thomas, E., Liegeois, J.F., Scuvee-Moreau, J., Seutin, V., 2005. SK channels control the firing pattern of midbrain dopaminergic neurons in vivo. *Eur J Neurosci* 22, 3111-3121.
- Weatherall, K.L., Goodchild, S.J., Jane, D.E., Marrion, N.V., 2010. Small conductance calcium-activated potassium channels: from structure to function. *Prog Neurobiol* 91, 242-255.
- Wemmer, D., Kallenbach, N.R., 1983. Structure of apamin in solution: a two-dimensional nuclear magnetic resonance study. *Biochemistry* 22, 1901-1906.
- Wolfart, J., Neuhoff, H., Franz, O., Roeper, J., 2001. Differential expression of the small-conductance, calcium-activated potassium channel SK3 is critical for pacemaker control in dopaminergic midbrain neurons. *J Neurosci* 21, 3443-3456.
- Wollmuth, L.P., Sobolevsky, A.I., 2004. Structure and gating of the glutamate receptor ion channel. *Trends Neurosci* 27, 321-328.
- Wulff, H., Gutman, G.A., Cahalan, M.D., Chandy, K.G., 2001. Delineation of the clotrimazole/TRAM-34 binding site on the intermediate conductance calcium-activated potassium channel, IKCa1. *J Biol Chem* 276, 32040-32045.
- Xia, X.M., Fakler, B., Rivard, A., Wayman, G., Johnson-Pais, T., Keen, J.E., Ishii, T., Hirschberg, B., Bond, C.T., Lutsenko, S., Maylie, J., Adelman, J.P., 1998. Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature* 395, 503-507.
- Yellen, G., 2002. The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature* 419, 35-42.
- Zhou, Y., Morais-Cabral, J.H., Kaufman, A., MacKinnon, R., 2001. Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K<sup>+</sup> channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature* 414, 43-48.

## 10 Annexes : Publications relatives au mémoire

Les trois publications relatives au présent travail sont jointes ci-après.

- Inhibition of K(Ca)<sub>2.2</sub> and K(Ca)<sub>2.3</sub> channel currents by protonation of outer pore histidine residues
- Allosteric block of KCa<sub>2</sub> channels by apamin
- The sigma agonist 1,3-di-o-tolyl-guanidine directly blocks SK channels in dopaminergic neurons and in cell lines

# Inhibition of $K_{Ca2.2}$ and $K_{Ca2.3}$ channel currents by protonation of outer pore histidine residues

Samuel J. Goodchild,<sup>1</sup> Cedric Lamy,<sup>2</sup> Vincent Seutin,<sup>2</sup> and Neil V. Marrion<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Physiology and Pharmacology, School of Medical Sciences, University of Bristol, Bristol BS8 1TD, England, UK

<sup>2</sup>Laboratory of Pharmacology, Giga-Neurosciences, University of Liège, 4000 Liège, Belgium

Ion channels are often modulated by changes in extracellular pH, with most examples resulting from shifts in the ionization state of histidine residue(s) in the channel pore. The application of acidic extracellular solution inhibited expressed  $K_{Ca2.2}$  (SK2) and  $K_{Ca2.3}$  (SK3) channel currents, with  $K_{Ca2.3}$  (pIC<sub>50</sub> of ~6.8) being approximately fourfold more sensitive than  $K_{Ca2.2}$  (pIC<sub>50</sub> of ~6.2). Inhibition was found to be voltage dependent, resulting from a shift in the affinity for the rectifying intracellular divalent cation(s) at the inner mouth of the selectivity filter. The inhibition by extracellular protons resulted from a reduction in the single-channel conductance, without significant changes in open-state kinetics or open probability.  $K_{Ca2.2}$  and  $K_{Ca2.3}$  subunits both possess a histidine residue in their outer pore region between the transmembrane S5 segment and the pore helix, with  $K_{Ca2.3}$  also exhibiting an additional histidine residue between the selectivity filter and S6. Mutagenesis revealed that the outer pore histidine common to both channels was critical for inhibition. The greater sensitivity of  $K_{Ca2.3}$  currents to protons arose from the additional histidine residue in the pore, which was more proximal to the conduction pathway and in the electrostatic vicinity of the ion conduction pathway. The decrease of channel conductance by extracellular protons was mimicked by mutation of the outer pore histidine in  $K_{Ca2.2}$  to an asparagine residue. These data suggest that local interactions involving the outer turret histidine residues are crucial to enable high conductance openings, with protonation inhibiting current by changing pore shape.

## INTRODUCTION

The  $K_{Ca2.2}$  (SK2) and  $K_{Ca2.3}$  (SK3) potassium channels are characterized by their activation by intracellular calcium ( $Ca^{2+}$ ; half-maximal activation of 0.3–0.7  $\mu$ M), voltage independence, and small single-channel conductance of 10–20 pS (Köhler et al., 1996; Hirschberg et al., 1998; Xia et al., 1998). Because of the distinct spatial distribution of the channel subtypes in the mammalian brain and their involvement in the generation of afterhyperpolarization currents, there has been considerable interest in developing subtype-selective pharmacological tools to study these channels (Stocker and Pedarzani, 2000; Shakkottai et al., 2001; Sailer et al., 2002, 2004; Stocker et al., 2004; Dilly et al., 2005). The predicted pore regions of  $K_{Ca2.2}$  and  $K_{Ca2.3}$  display high sequence homology. Each channel subunit possesses a histidine (H) residue that is predicted to reside within the extracellular-facing region of the outer pore (H337 in  $K_{Ca2.2}$  and H491 in  $K_{Ca2.3}$ ). In addition, the  $K_{Ca2.3}$  subunit exhibits an additional H (H522) that is seen as asparagine (N368) in  $K_{Ca2.2}$ . Histidine residues in channels' outer pore regions have been reported to be proton interaction sites that mediate inhibition of currents. For example, proton-induced inhibition is ob-

served for several different potassium channels, including the voltage-gated *Shaker*-like plant channel ATK3 (Geiger et al., 2002), Kv1.5 (Steidl and Yool, 1999; Jäger and Grissmer, 2001; Kehl et al., 2002), Kv1.4 (Claydon et al., 2000), Kv7.2/7.3 (Prole et al., 2003),  $K_{2P2.1}$  (Cohen et al., 2008), and the inward-rectifying channel Kir2.3 (Coulter et al., 1995; Ureche et al., 2008). Several mechanisms have been proposed to explain this inhibition. For example, Kv1.5 macroscopic current block is mediated through modifying gating and enhancing inactivation without any effect on single-channel conductance (Kwan et al., 2006). Macroscopic inhibition of both ATK3 and Kir2.3 channel currents resulted from a reduction in single-channel conductance (Coulter et al., 1995; Geiger et al., 2002), whereas inhibition of Kv7.2/7.3 heteromeric channel currents resulted from both effects on gating and single-channel conductance (Prole et al., 2003).

We demonstrate that macroscopic  $K_{Ca2.2}$  and  $K_{Ca2.3}$  current is inhibited by extracellular protons, with  $K_{Ca2.3}$  being more sensitive. Inhibition resulted from a reduction in single-channel conductance and, in particular for  $K_{Ca2.3}$ , a shift of inward rectification. We show that

V. Seutin and N.V. Marrion contributed equally to this paper.

Correspondence to Neil V. Marrion: N.V.Marrion@bris.ac.uk

Abbreviation used in this paper: GHK, Goldman-Hodgkin-Katz.

© 2009 Goodchild et al. This article is distributed under the terms of an Attribution-Noncommercial-Share Alike-No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.jgp.org/misc/terms.shtml>). After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution-Noncommercial-Share Alike 3.0 Unported license, as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>).

the outer pore histidine residues in the K<sub>Ca</sub>2.2 and K<sub>Ca</sub>2.3 channel act as proton sensors. The observed significant differences in modulation between the two subtypes provide insight into the role of such outer pore residues in channel function that might aid the development of subtype-selective modulators.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell culture, expression of channels, and mutagenesis

Wild-type rat K<sub>Ca</sub>2.2 (GenBank accession no. NM\_019314) and human K<sub>Ca</sub>2.3 (GenBank accession no. AF031815) channel DNA were subcloned into the mammalian plasmid expression vectors pcDNA3 (Invitrogen) and pFlagCMV2 (Sigma-Aldrich), respectively. Point mutations in K<sub>Ca</sub>2.2 (K<sub>Ca</sub>2.2(N368H), K<sub>Ca</sub>2.2(H337N), and K<sub>Ca</sub>2.2(H337N, N368H)) and K<sub>Ca</sub>2.3 (K<sub>Ca</sub>2.3(H522N) and K<sub>Ca</sub>2.3(H421N)) were introduced using a site-directed mutagenesis kit (Quickchange-XL; Agilent Technologies) and confirmed by dye termination DNA sequencing.

Channels were transiently expressed in HEK293 cells for electrophysiology. Cells were dissociated for passage using an EDTA solution and maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium, supplemented with 10% fetal calf serum and 1% penicillin/streptomycin (all from Invitrogen) at 37°C. Cells were plated onto 35-mm dishes (BD) 48 h before transfection for electrophysiology. Transient transfections of HEK293 cells were made using polyethylenimine (Johnson Matthey Plc) by combining channel plasmid DNA with enhanced green fluorescent protein DNA in a ratio of 1:1 to 1:10 (maximum plasmid content, 1 µg). Cells expressing enhanced green fluorescent protein were used for electrophysiology 12–24 h after transfection.

### Electrophysiology

**Solutions.** Expressed macroscopic currents were resolved using either whole cell or outside-out macropatch recording, with cells/patches being constantly superfused with external solutions of 160 or 5 mM potassium ([K<sup>+</sup>]<sub>o</sub>). The composition of the 160 mM K<sup>+</sup> (high K<sup>+</sup>) solution was (in mM): 120 KCl, 10 HEPES, 10 EGTA, 1.44 MgCl<sub>2</sub>, and 6.19 CaCl<sub>2</sub> (achieving a buffered concentration of 60 nM Ca<sup>2+</sup> and 1 mM Mg<sup>2+</sup>), with the pH adjusted to 7.4 with ~40 mM KOH. Extracellular Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> were set at this level to minimize concentration gradients for the divalent ions. Acidic solutions (pH <7.4) contained (in mM): 120 KCl, 10 KMes, 10 EGTA, 1.44 MgCl<sub>2</sub>, and 6.19 CaCl<sub>2</sub>, pH adjusted with KOH. The composition of the 5-mM K<sup>+</sup> (low K<sup>+</sup>) solution was (in mM): 110 NaCl, 5 KCl, 10 HEPES(Na), 10 EGTA, 1.44 MgCl<sub>2</sub>, and 6.19 CaCl<sub>2</sub> (achieving a buffered concentration of 60 nM Ca<sup>2+</sup> and 1 mM Mg<sup>2+</sup>), with the pH adjusted to 7.4 with ~23 mM NaOH. Acidic low K<sup>+</sup> solutions contained (in mM): 110 NaCl, 5 KMes, 10 EGTA, 1.44 MgCl<sub>2</sub>, and 6.19 CaCl<sub>2</sub>, pH adjusted with NaOH.

Whole cell and macropatch recording electrodes were fabricated from KG-33 glass (Friedrich & Dimmock, Inc.) and filled with a solution of composition (in mM): 120 KCl, 10 HEPES, 10 BAPTA, 1.5 ATP(Na<sub>2</sub>), 2.34 MgCl<sub>2</sub>, and 8.98 CaCl<sub>2</sub> (added to achieve 1 µM free Ca<sup>2+</sup>), pH 7.4, which gave resistances of 2–4 MΩ. Zn<sup>2+</sup> solutions were prepared from a 500-mM stock (pH of ~2), and the pH was adjusted to 7.4 with KOH. Zn<sup>2+</sup> in solution can form the insoluble ZnOH<sub>2</sub>, therefore limiting the maximum solubility of Zn<sup>2+</sup> at pH 7.4 to 4.5 mM.

Electrodes contained a high K<sup>+</sup> solution for excised inside-out single-channel Ca<sup>2+</sup> activation and noise analysis recordings of the following composition (in mM): 97 K aspartate or K methylsulfate (MeSO<sub>4</sub>), 30 KCl, 10 HEPES, 10 EGTA, 1.44 MgCl<sub>2</sub>, and 6.19 CaCl<sub>2</sub> (achieving a buffered concentration of 60 nM Ca<sup>2+</sup> and

1 mM Mg<sup>2+</sup>), with the pH adjusted to 7.4 with KOH. The intracellular side of excised inside-out patches was bathed in the same high K<sup>+</sup> solution, with free Ca<sup>2+</sup> buffered to 60 nM, 200 nM (adding 1.18 MgCl<sub>2</sub> and 8.445 CaCl<sub>2</sub>), 300 nM (adding 1.12 MgCl<sub>2</sub> and 8.9 CaCl<sub>2</sub>), 600 nM (adding 1.07 MgCl<sub>2</sub> and 9.4 CaCl<sub>2</sub>), or 1 µM (adding 1.04 MgCl<sub>2</sub> and 9.64 CaCl<sub>2</sub>). The effect of extracellular acidic pH on single-channel and noise analysis recordings was studied with the electrode containing the high K<sup>+</sup> solution, which was buffered to the stated pH by replacing HEPES with Mes.

The liquid junction potential calculated between high K<sup>+</sup> solutions was <2 mV, whereas that between low K<sup>+</sup> external solutions and electrode solution was calculated to be ~8 mV. Neither was corrected for. All standard chemicals were bought from Sigma-Aldrich.

### Recording

Whole cell and macropatch currents were recorded with an Axopatch 200A (MDS Analytical Technologies). Capacitance and series resistance compensation (≥95%) was only used for whole cell recordings. Currents were low-pass filtered at 1 kHz (eight-pole Bessel; Frequency Devices, Inc.) and acquired at 20 kHz using Pulse (HEKA). All recordings were performed at room temperature (20–25°C). Extracellular solutions were exchanged by a whole bath perfusion system for pH experiments, with a rapid solution exchange system (RSC200; Biologic) used for noise analysis. A long-lasting current run-up was sometimes observed after current was inhibited by acidic extracellular pH (not depicted). Current amplitude was stabilized after returning to pH 7.4 and only accepted for analysis if the inhibition was reversible. Electrodes for single-channel recording were fabricated from quartz capillary (King Precision Glass, Inc.), with resistances of 7–12 MΩ. Single-channel currents were observed by continuous recording at all potentials. Channel currents were filtered at 1 kHz and acquired at 20 kHz using the Pulse program. Single-channel activity was analyzed with TAC (Bruxon) using the 50% threshold technique, and all transitions were visually inspected before being accepted. Single-channel amplitudes were estimated from Gaussian fits of amplitude histograms derived from events >1 ms to account for the rise time of the Bessel filter.

### Data analysis

Concentration–inhibition relationships to extracellular protons (H<sup>+</sup>) were plotted as fractional current remaining ( $I/I_{cont}$ ) and were fitted with a Hill equation of the form:

$$\frac{I}{I_{cont}} = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + 10^{((\text{Log}(IC_{50}) - [\text{H}^+])n_h))}}, \quad (1)$$

where  $I$  was the recorded macroscopic current,  $I_{cont}$  the current at pH 7.4,  $A_1$  the minimum fraction of current remaining,  $A_2$  the maximum, and  $IC_{50}$  the concentration in molar of protons that evoked 50% of the maximum inhibition. The  $IC_{50}$  concentration is also quoted as  $-\log IC_{50}$  (pIC<sub>50</sub>) in the text. Unless stated otherwise, fitting was performed on data from individual experiments, and the fit parameters quoted are of the mean ± SEM of the individual fits. For display purposes, figures show Eq. 1 fitted to mean data. Fitting was performed using Prism (GraphPad Software, Inc.).

### Nonstationary noise analysis

Excised inside-out macropatches were held at –50 mV. Currents were acquired using Pulse (HEKA), and only sweeps without artifacts from the solution exchange system were accepted. Mean current ( $I$ ) and variance ( $\sigma^2$ ) were calculated for each ensemble of current traces using Clampfit (MDS Analytical Technologies). The single-channel current ( $i$ ) and the number of channels ( $N$ )



in each patch were then obtained by fitting a plot of the variance against the mean current using Eq. 2 (Sigworth, 1980; Hartveit and Veruki, 2007):

$$\sigma^2 = iI - \frac{I^2}{N}. \quad (2)$$

Single-channel conductance ( $\gamma$ ) and maximum open probability at the maximum mean  $I$  ( $P(o)$ ) were calculated. Curve fitting of equations to the data were performed using Origin software (OriginLab Corp.). Statistical significance was evaluated using Prism (GraphPad Software, Inc.) by either the Student's  $t$  test or one- or two-way ANOVA with Bonferroni post hoc test as appropriate.

The validity of applying this analysis to  $K_{Ca2}$  channel activity was tested by simulation of three different gating schemes using CSIM (MDS Analytical Technologies; see Fig. 4 for gating schemes). Simulated deactivation current relaxations (128) were generated for each gating scheme using 80 independent channels, except for the scheme in Fig. 4 B, which used 40 channels of high conductance and 40 channels of low conductance. Each simulation used the open channel as the initial state. Transition rates shown in Fig. 4 were obtained from Hirschberg et al. (1998). Data were analyzed in the same manner as experimentally derived data using Clampfit. Amplitude histograms were produced by running the simulation of each gating scheme with one channel, with data analyzed in the same way as experimentally derived data using TAC and TACfit.

#### Homology model construction

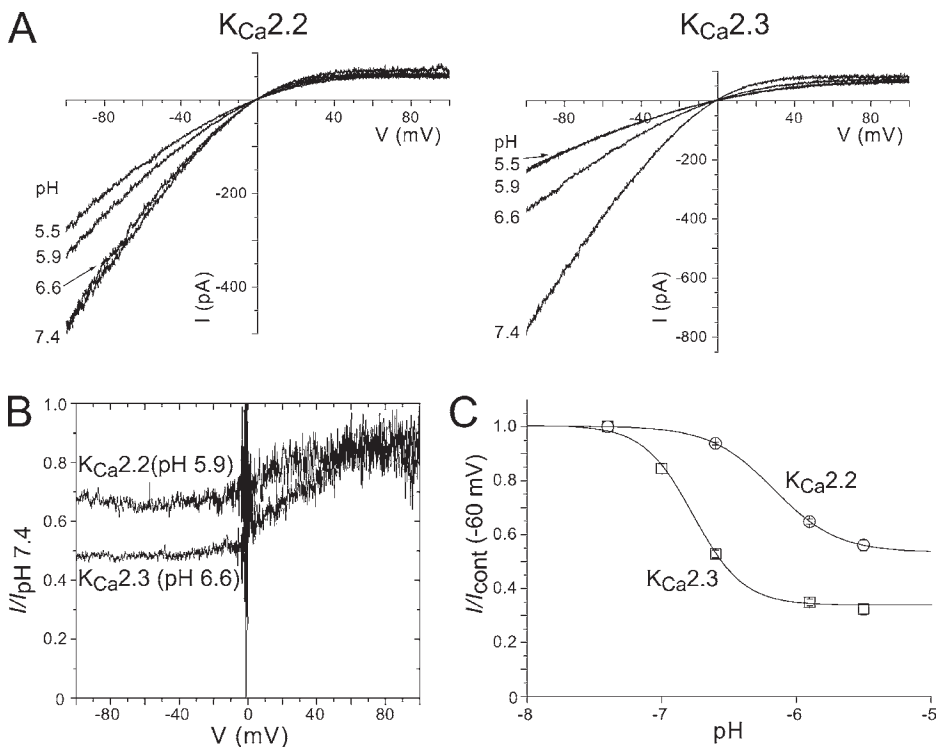
Putative locations of pore residues were predicted based on a model of the  $K_{Ca2.2}$  pore region. The pore region of  $K_{Ca2.2}$  spanning S5-Phelix-SF-S6 was modeled using the mammalian Kv1.2 pore (PDB: 2a79) (Long et al., 2005) as a template through the comparative modeling web server, Geno 3D (Combet et al., 2002).

## RESULTS

### Extracellular protons ( $[H^+]_o$ ) inhibited $K_{Ca2.2}$ and $K_{Ca2.3}$ macroscopic currents

Ramp currents from outside-out macropatches with an intracellular  $Ca^{2+}$  concentration of 1  $\mu M$  showed inwardly rectifying  $K_{Ca2.2}$  and  $K_{Ca2.3}$  currents, which were inhibited differentially by increasing concentrations of extracellular protons ( $[H^+]_o$ ) (Fig. 1 A).  $K_{Ca2.3}$  currents showed a greater sensitivity to  $[H^+]_o$  than the  $K_{Ca2.2}$ -mediated current, with the  $K_{Ca2.3}$  current being inhibited by pH 6.6 while the  $K_{Ca2.2}$  current was unaffected. The effect of  $[H^+]_o$  appeared to be voltage dependent, with inhibition being most apparent at potentials negative to 0 mV (Fig. 1 B). Inhibition at  $-60$  mV by decreasing extracellular pH was plotted for both  $K_{Ca2.2}$  and  $K_{Ca2.3}$ . The maximum inhibition by pH 5.5 was significantly greater for  $K_{Ca2.3}$  currents ( $78 \pm 0.1\%$ ;  $n = 4$ ) than that observed for  $K_{Ca2.2}$  currents ( $44 \pm 2.0\%$ ;  $n = 3$ ;  $P < 0.0005$ ). Fitting the data with the Hill equation showed the higher sensitivity of  $K_{Ca2.3}$  to  $[H^+]_o$  ( $IC_{50} = 158$  nM and  $pIC_{50} = 6.8$  nM;  $n_h = -2.1 \pm 0.1$  and  $n = 4-11$ ) compared with inhibition of the  $K_{Ca2.2}$  current ( $IC_{50} = 63$  nM and  $pIC_{50} = 6.2$  nM;  $n_h = -1.9 \pm 0.1$  and  $n = 3$ ;  $pIC_{50}$ ,  $P < 0.0001$ ;  $n_h$ , not significant). The steep Hill slopes for  $K_{Ca2.2}$  and  $K_{Ca2.3}$  suggest that more than one proton binds to inhibit current and positive cooperativity exists for inhibition.

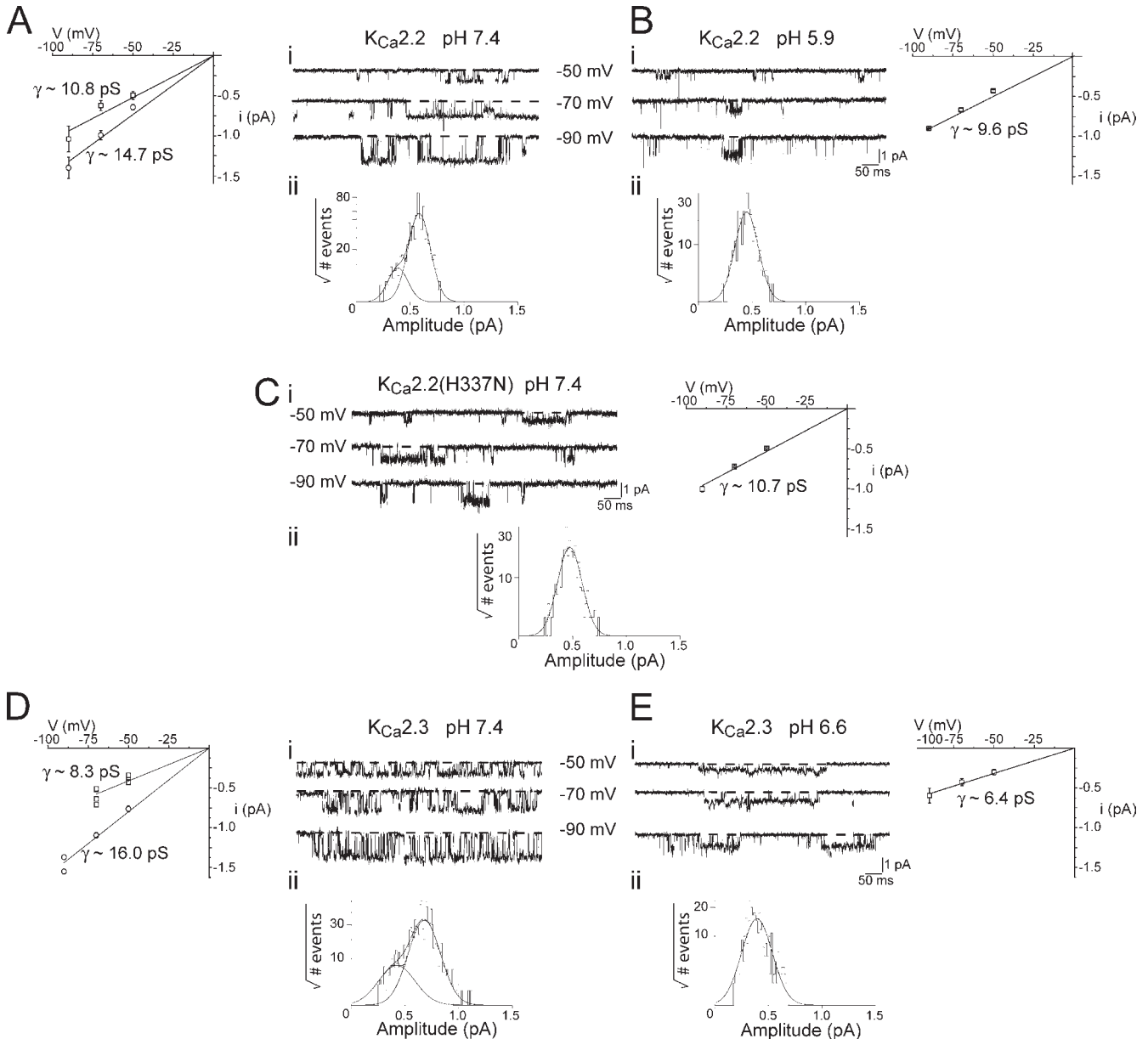
Although potential effects of extracellular pH on the determined levels of intracellular  $Ca^{2+}$  were controlled



**Figure 1.** Differential inhibition of  $K_{Ca2.3}$  and  $K_{Ca2.2}$  channel macroscopic current by increasing  $[H^+]_o$ . (A) Representative outside-out macropatch  $K_{Ca2.2}$  and  $K_{Ca2.3}$  currents evoked by voltage ramps from  $-100$  to  $+100$  mV over 1 s in control conditions (pH 7.4) and in pH 6.6, 5.9, and 5.5. (B) Inhibition was voltage dependent, with less inhibition observed at depolarized levels. This was apparent when the fraction of unblocked current ( $K_{Ca2.2}$ ,  $I_{pH5.9}/I_{pH7.4}$ ;  $K_{Ca2.3}$ ,  $I_{pH6.6}/I_{pH7.4}$ ) was plotted against membrane voltage for  $K_{Ca2.2}$  and  $K_{Ca2.3}$  currents shown in A, indicating that block negative to 0 mV was voltage independent, and less inhibition was observed as the membrane potential approached  $+100$  mV. (C) Concentration-inhibition relationships for the inhibition of  $K_{Ca2.2}$  and  $K_{Ca2.3}$  by  $[H^+]_o$ . Data points from different patches ( $n = 3-11$ ) were fit with Eq. 1.

for by using intracellular BAPTA, it was possible that the reduction of macroscopic  $K_{Ca}2$  current resulted from a change in the  $Ca^{2+}$ -dependent gating of channels. Inside-out macropatches with electrodes containing

either pH 7.4 or 5.9 were exposed to increasing intracellular concentrations of free  $Ca^{2+}$  to determine the effects on  $Ca^{2+}$ -dependent gating. Extracellular acidosis had no significant effect (unpaired  $t$  test;  $n = 3-5$  patches)



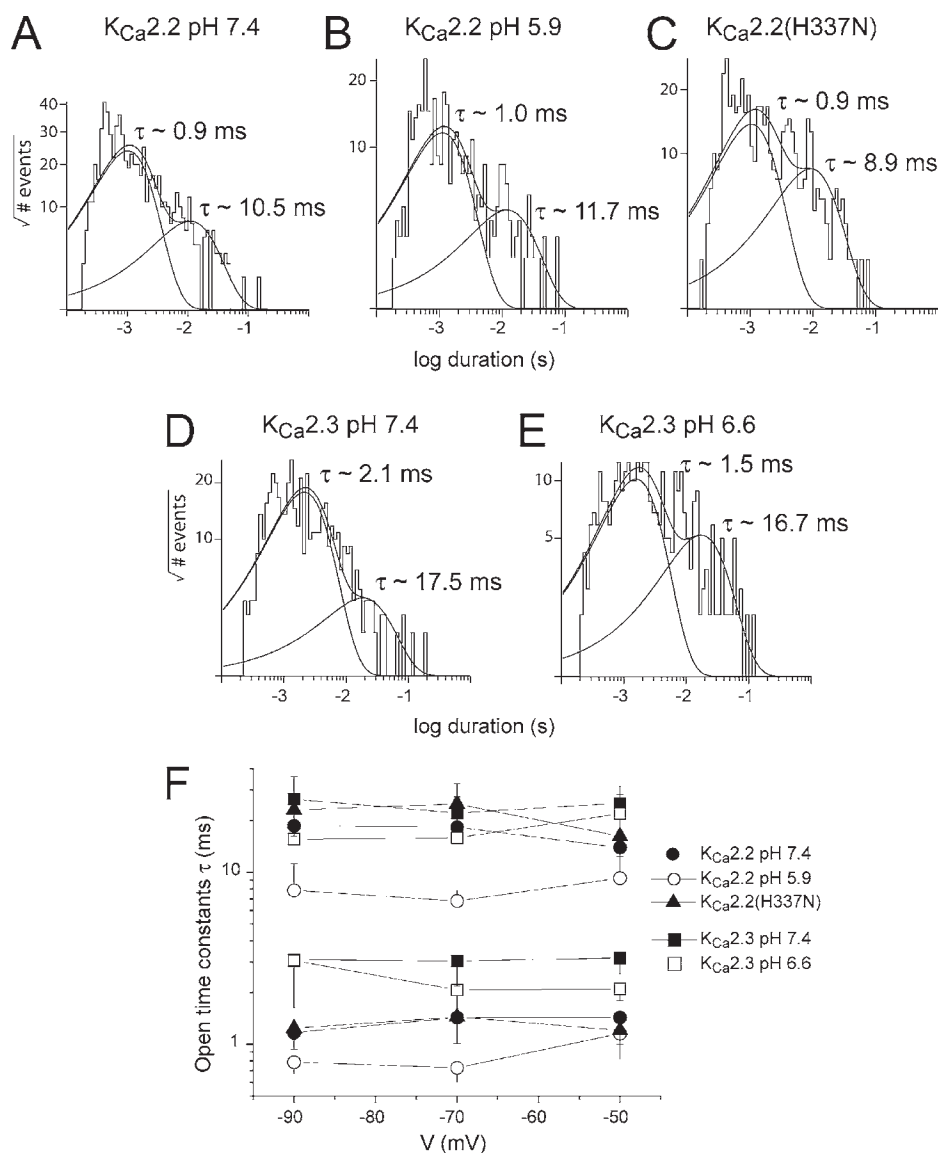
**Figure 2.** Extracellular acidosis reduced single  $K_{Ca}2.2$  and  $K_{Ca}2.3$  channel conductance. (A, i) Single  $K_{Ca}2.2$  channel activity at extracellular pH 7.4 in the presence of 200 nM of intracellular  $Ca^{2+}$  at  $-50$ ,  $-70$ , and  $-90$  mV. (Left) Current–voltage relationship showing that  $K_{Ca}2.2$  channels exhibited two conductance levels of  $\sim 15$  and  $11$  pS. (A, ii) Amplitude histogram of channel openings at  $-50$  mV, with mean amplitudes of  $0.58$  and  $0.39$  pA. (B, i) Acidification of the pipette (external) solution to pH 5.9 resulted in lower conductance openings. (Right)  $K_{Ca}2.2$  channels exhibited only one conductance level in pH 5.9 of  $\sim 9.63$  pS. (B, ii) Amplitude histogram of channel openings at  $-50$  mV, with a mean amplitude of  $0.45$  pA. (C, i) Single  $K_{Ca}2.2(H337N)$  channel openings at extracellular pH 7.4 of low amplitude. (Right) Current–voltage relationship showing that the mutant channel exhibited only low conductance openings of  $10.7$  pS. (C, ii) Amplitude histogram of channel openings at  $-50$  mV, with a mean amplitude of  $0.47$  pA. (D, i) Single  $K_{Ca}2.3$  channel openings at extracellular pH 7.4 activated by 200 nM of intracellular  $Ca^{2+}$  at  $-50$ ,  $-70$ , and  $-90$  mV. (Left)  $K_{Ca}2.3$  channels exhibited two conductance levels of  $\sim 16$  and  $8$  pS. (D, ii) Amplitude histogram of channel openings at  $-50$  mV, with mean amplitudes of  $0.68$  and  $0.41$  pA. (E, i)  $K_{Ca}2.3$  channels only exhibited low conductance openings in pH 6.6. (Right) Current–voltage relationship showing that conductance was  $\sim 6.5$  pS in extracellular pH 6.6. (E, ii) Amplitude histogram of channel openings at  $-50$  mV, with a mean amplitude of  $0.37$  pA.

on  $EC_{50}$  or Hill slopes for either  $K_{Ca2.2}$  (pH 7.4,  $EC_{50} = 281 \pm 29$  nM and  $n_h = 5.98 \pm 1.27$ ; pH 5.9,  $EC_{50} = 231 \pm 15$  nM and  $n_h = 6.21 \pm 0.96$ ) or  $K_{Ca2.3}$  (pH 7.4,  $EC_{50} = 257 \pm 21$  nM and  $n_h = 5.22 \pm 0.55$ ; pH 5.9,  $EC_{50} = 284 \pm 12$  nM and  $n_h = 5.86 \pm 0.24$ ) current, indicating that inhibition by protons was independent of changes in the mechanics of  $Ca^{2+}$  gating. These data suggested that inhibition of macroscopic current might have resulted from changes in single-channel properties.

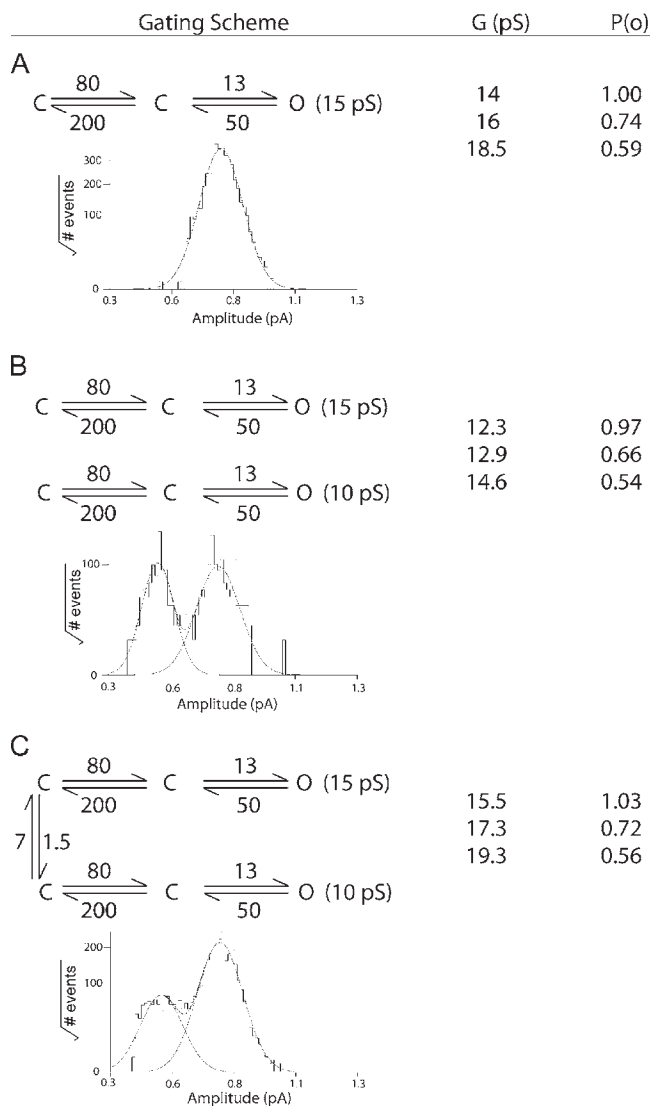
#### Extracellular protons inhibited $K_{Ca2}$ current by decreasing single-channel conductance

Extracellular protons were proposed to inhibit  $Kv1.5$  current by reducing channel  $P(o)$  (Kwan et al., 2006). In contrast, a reduction in single-channel conductance was suggested to underlie the inhibition of inward-rectifying  $K^+$  current (Coulter et al., 1995; Geiger et al., 2002). We used a combination of single-channel record-

ing and nonstationary noise analysis to resolve which channel property might be affected to underlie the inhibition of macroscopic  $K_{Ca2}$  current. Excised inside-out recording of  $K_{Ca2.2}$  and  $K_{Ca2.3}$  channels showed in extracellular pH 7.4 that both channels exhibited two conductance levels of 15 and 11 pS for  $K_{Ca2.2}$  channels ( $14.7 \pm 1.1$  and  $10.8 \pm 1.4$  pS;  $n = 3$ ) (Fig. 2 A) and 16 and 8 pS for  $K_{Ca2.3}$  ( $15.8 \pm 0.6$  and  $8.3 \pm 0.6$  pS;  $n = 5$  and 3) (Fig. 2 D), respectively. Both amplitudes were observed in patches that contained single-level activity bathed in 200 nM  $Ca^{2+}$ , and rare transitions between open states were resolved (Fig. 2 A). Recording single-channel activity at the extracellular pH that was close to the determined  $IC_{50}$  values showed that conductance was reduced for both channel subtypes by extracellular acidosis, with only a 10-pS ( $9.6 \pm 0.07$  pS;  $n = 3$ ) and a 6.5-pS ( $6.4 \pm 0.8$  pS;  $n = 4$ ) conductance level observed for  $K_{Ca2.2}$  channels and  $K_{Ca2.3}$  channels, respectively



**Figure 3.**  $K_{Ca2.2}$  and  $K_{Ca2.3}$  channel open-state kinetics were not changed by extracellular acidosis. Open-time histograms for all single-level openings of both amplitudes at  $-50$  mV from patches containing (A)  $K_{Ca2.2}$  in extracellular pH 7.4, (B)  $K_{Ca2.2}$  in pH 5.9, (C)  $K_{Ca2.2}(H337N)$  in pH 7.4, (D)  $K_{Ca2.3}$  in pH 7.4, and (E)  $K_{Ca2.3}$  in pH 6.6. Distributions were best fit by the sum of two exponentials with  $\tau$  of 1 and 11 ms for  $K_{Ca2.2}$  and 2 and 17 ms for  $K_{Ca2.3}$ . (F) Mean open times for  $K_{Ca2.2}$  and  $K_{Ca2.3}$  channel openings at pH 7.4 and 5.9, and those of the mutant  $K_{Ca2.2}$  (H337N) channel were plotted against voltage ( $n = 3$ ). Each open-time component was voltage independent (one-way ANOVA;  $P > 0.05$ ) and were not affected by lowering the extracellular pH (two-way repeated measures ANOVA;  $P > 0.05$ ).



**Figure 4.** Validity of applying nonstationary noise analysis to  $K_{Ca2}$  channel currents. Simulated deactivation currents using the three illustrated gating schemes were subjected to mean-variance analysis to obtain estimates of channel conductance and  $P(o)$ . Estimates were obtained for three time points in the deactivation 0.3, 10, and 20 ms after the start of the relaxation. These data showed that nonstationary noise analysis can be applied to data obtained from a channel that exhibited two conductance states, such as  $K_{Ca2.2}$  and  $K_{Ca2.3}$  channels (see Fig. 2).

(Fig. 2, B and E). The observed conductances were not significantly different from the lower conductance class observed in pH 7.4, suggesting that extracellular protons promoted the lower conductance state at the expense of the higher conductance state. These data suggested that the promotion of low amplitude openings was a significant contributor to the reduction of macroscopic current.

Excised inside-out patches usually contained multiple channels that were revealed by observing channel activity in the presence of  $1 \mu\text{M Ca}^{2+}$ , which is close to

the maximum for  $K_{Ca2}$  activation and correlated with a  $P(o)$  of  $\sim 0.6$ – $0.8$  (Hirschberg et al., 1998; Xia et al., 1998). Lower activity (giving single-level openings) was obtained by bathing patches in  $200 \text{ nM free Ca}^{2+}$ , and the effect of extracellular pH on open-state kinetics was determined under these conditions to resolve whether the reduction of macroscopic current might be contributed by a decrease in channel open time.  $K_{Ca2.2}$  and  $K_{Ca2.3}$  channel open-state kinetics were best described by the sum of two exponentials, with  $\tau$  of  $\sim 1$ – $2$  and  $11$ – $17$  ms at extracellular pH 7.4 (Fig. 3, A and D). Analysis of openings in pH 5.9 and 6.6 gave open-state histograms that were best fit with the sum of two exponentials of similar  $\tau$  (Fig. 3, B and E). Plotting the mean values for each open-time component against membrane voltage showed that channel open-state kinetics were independent of voltage (Hirschberg et al., 1998), and that extracellular protons had no significant effect on open-state kinetics (one-way ANOVA;  $P > 0.05$ ) (Fig. 3 F).

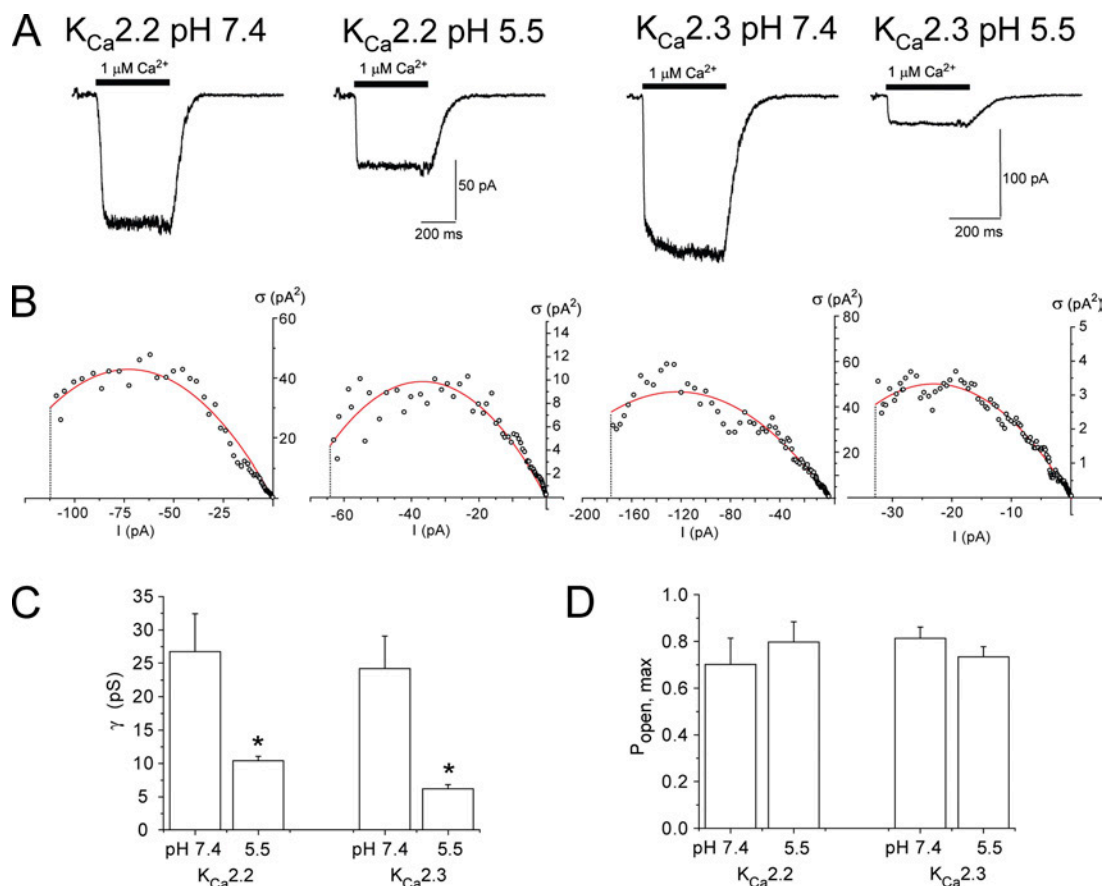
Channel  $P(o)$  was extremely difficult to reliably obtain with multichannel patches containing low amplitude openings promoted by lowering extracellular pH. We wanted to use nonstationary noise analysis to get estimates of  $P(o)$ , together with weighted single-channel amplitude ( $i$ ) and total number of channels active in a patch ( $N$ ). It was important to determine whether this technique could be applied to a channel that displayed two amplitude levels by using simulated channel data derived from three gating schemes (Fig. 4). Estimates of channel conductance and  $P(o)$  were taken from three time points during the deactivation of a simple C-C-O scheme of conductance of  $15 \text{ pS}$  (Fig. 4 A). Channel conductance was reasonably well estimated with this technique, with most error occurring when  $P(o)$  was lowest. In contrast, channel conductance was not well estimated when noise was contributed by two classes of channels, with conductances of  $10$  and  $15 \text{ pS}$  (Fig. 4 B). Importantly, differences in estimated  $P(o)$  were noted between this scheme and the scheme in Fig. 4 A. Finally, the scheme in Fig. 4 C was used where a channel exhibited two amplitude levels to replicate that observed for both  $K_{Ca2.2}$  and  $K_{Ca2.3}$  channels. This gating scheme gave estimated  $P(o)$  values that were very similar to those seen with the scheme in Fig. 4 A. Analysis of these simulated data showed that nonstationary noise analysis could be applied to  $K_{Ca2}$  channel activity to obtain estimates of  $P(o)$ .

Expressed  $K_{Ca2.2}$  or  $K_{Ca2.3}$  channels were repeatedly activated by rapid application of  $1 \mu\text{M Ca}^{2+}$  to excised inside-out macropatches. The variance was calculated from the deactivation relaxation evoked by the rapid removal of  $1 \mu\text{M Ca}^{2+}$  (Fig. 5, A–C). Plotting the variance ( $\sigma$ ) against mean current ( $I$ ) produced a relationship fit with Eq. 2, yielding estimates of single-channel conductance ( $\gamma$ ) (Fig. 5 C),  $P(o)$  (Fig. 5 D), and  $N$ . Decreasing

the extracellular pH from 7.4 to 5.5 reduced  $\gamma$  of  $K_{Ca2.2}$  channels from  $23.6 \pm 5.7$  to  $10.3 \pm 0.6$  pS ( $P < 0.05$ ;  $n = 3$ ) (Fig. 5 C). Similar decreases in  $\gamma$  by pH 5.5 were observed for  $K_{Ca2.3}$  channels, where it decreased from  $24.1 \pm 4.9$  pS at pH 7.4 to  $6.04 \pm 1.4$  pS in pH 5.5 ( $P < 0.03$ ;  $n = 3$ ) (Fig. 5 C). These data are consistent with the estimates of single  $K_{Ca2.2}$  and  $K_{Ca2.3}$  channel conductances in the presence of both pH 7.4 and 5.5 (Fig. 2). Channel P(o) activated by  $1 \mu\text{M Ca}^{2+}$  for both subtypes was estimated to be  $0.7 \pm 0.1$  ( $n = 3$ ) for  $K_{Ca2.2}$  at pH 7.4 and  $0.8 \pm 0.09$  at pH 5.5, and  $0.81 \pm 0.05$  for  $K_{Ca2.3}$  at pH 7.4 and  $0.73 \pm 0.04$  at pH 5.5 (no significant difference) (Fig. 5 D), showing that extracellular protons did not affect channel P(o). These data show that neither changes in open-state kinetics nor channel P(o) underlie the inhibition of macroscopic current by extracellular protons, suggesting that the promotion of low conductance openings was the principal mechanism underlying inhibition.

A histidine residue in the S5-P helix outer pore region was required for current inhibition

The amino acid sequences of  $K_{Ca2.2}$  and  $K_{Ca2.3}$  channels were aligned, and the predicted extracellular pore regions of the channel were examined for residues that could be ionized by increasing extracellular  $[\text{H}^+]_o$ . Histidine (H) residues are weakly basic ( $\text{pK}_a$  of  $\sim 6$ ), acquiring a single-positive charge by protonation across the pH range that has been examined (pH 7.4–5.5). Fig. 6 displays the pore region sequence alignment of the channels with the H residues highlighted. Both channels share an H residue in homologous positions in the outer pore region (H337 in  $K_{Ca2.2}$  and H491 in  $K_{Ca2.3}$ ) (Fig. 6, A–C), and it was hypothesized that the protonation of H337 of  $K_{Ca2.2}$  and H491 in  $K_{Ca2.3}$  underlay the inhibition of macroscopic current by extracellular protons. Mutation of H to the polar but unionizable asparagine residue (N) was done in both  $K_{Ca2.2}$ (H337N) and  $K_{Ca2.3}$ (H491N). The application of extracellular



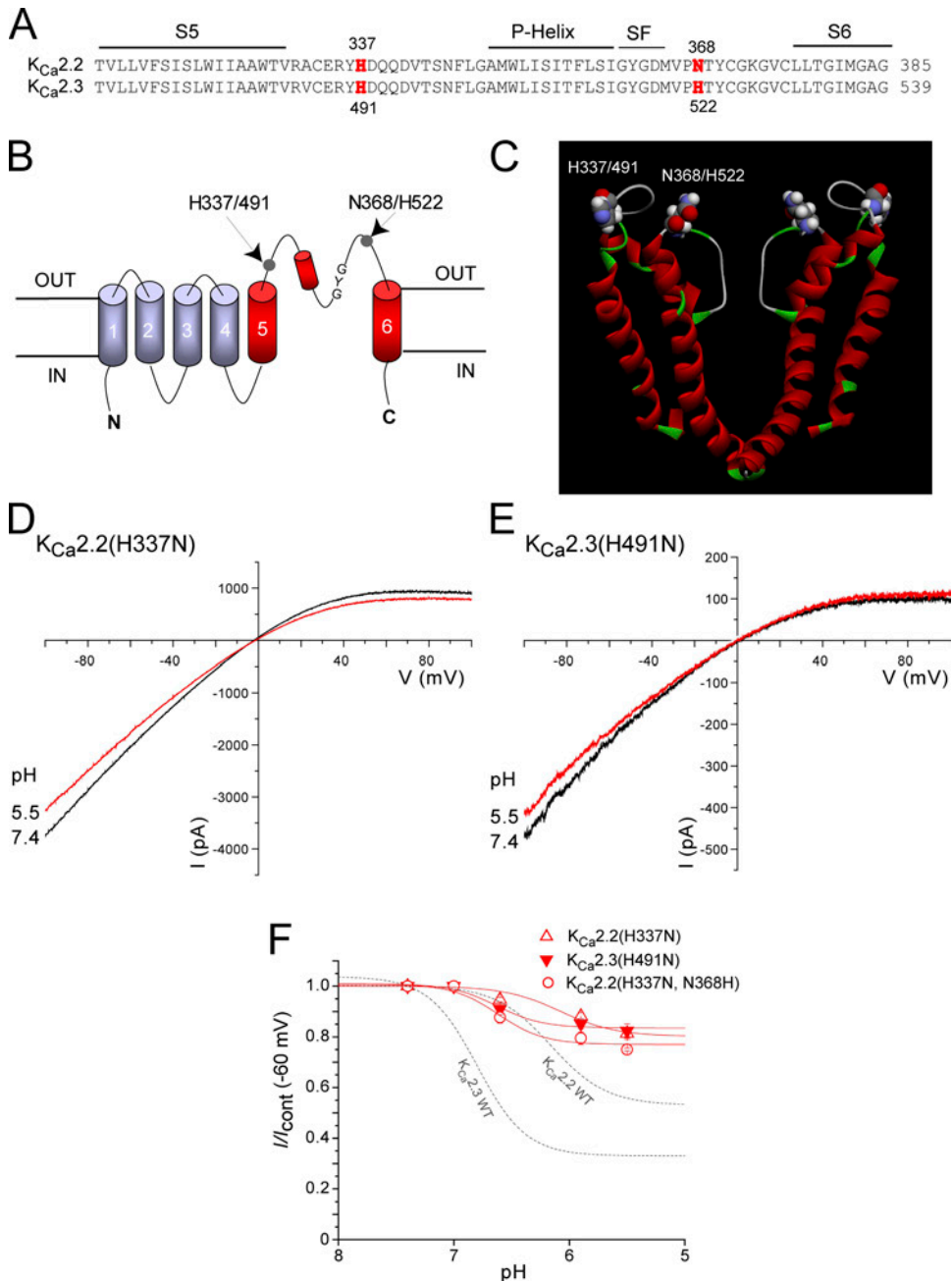
**Figure 5.**  $K_{Ca2.2}$  and  $K_{Ca2.3}$  channel P(o) was not affected by extracellular  $[\text{H}^+]_o$ . Nonstationary noise analysis of  $K_{Ca2.2}$  and  $K_{Ca2.3}$  channel currents in extracellular pH 7.4 or 5.5 was used to estimate channel P(o). (A) Representative traces from inside-out macropatches containing  $K_{Ca2.2}$  or  $K_{Ca2.3}$  channels in different external pHs held at  $-50$  mV. Patches were bathed in  $60$  nM  $\text{Ca}^{2+}$ , and current was activated by rapid application of  $1 \mu\text{M Ca}^{2+}$  for  $500$  ms. (B) Plots of variance ( $\sigma^2$ ) against mean current ( $I$ ) were fit with Eq. 2 to give estimates of single-channel amplitude ( $i$ ), which were converted to conductance ( $\gamma$ ) using  $\gamma = i/V$ . Channel P(o) was calculated from  $I_{\text{max}}/Ni$ . Plots are data reduced for clarity, and curve-fitting procedures were performed on full datasets. (C) Nonstationary noise analysis estimates for  $\gamma$  showed a significant reduction evoked by pH 5.5 for  $K_{Ca2.2}$  ( $n = 3$ ;  $P < 0.05$ ) and  $K_{Ca2.3}$  ( $n = 3$ ;  $P < 0.03$ ). (D) Neither  $K_{Ca2.2}$  nor  $K_{Ca2.3}$  channel P(o) was changed by extracellular pH 5.5.



pH 5.5 to either mutant had very little effect on macroscopic current (Fig. 6, D and E). Full concentration–inhibition relationships for both mutants showed that they exhibited significantly reduced sensitivity to  $[H^+]_o$  over the pH range of 7.4 to 5.5 (Fig. 6 F). These data indicated that the outer pore H common to both channel subtypes was the molecular target for titration by protons.

Previous data showed that extracellular protons did not inhibit  $K_{Ca}2.2$  or  $K_{Ca}2.3$  currents by reducing the sensitivity of the channel to activation by intracellular  $Ca^{2+}$ . Consistent with this was the finding that the sen-

sitivity of  $K_{Ca}2.2(H337N)$  to activation by intracellular  $Ca^{2+}$  was not different from wild-type channels ( $K_{Ca}2.2(H337N)$ ,  $EC_{50} = 227 \pm 8$  nM;  $n_h = 5.61 \pm 0.34$ ). Our data indicate the primary role of the outer pore H residue in mediating the inhibition of macroscopic  $K_{Ca}2$  current, which is at least in part mediated by a reduction in single-channel conductance. Consistent with the above data, the mutant channel  $K_{Ca}2.2(H337N)$  that was insensitive to  $[H^+]_o$  inhibition, displayed only low conductance openings ( $10.7 \pm 0.26$  pS;  $n = 3$ ) (Fig. 2 C), but with unchanged open-state kinetics (Fig. 3 C). This conductance state was very similar to both the lower



**Figure 6.** The outer pore histidine residue common to both  $K_{Ca}2.2$  and  $K_{Ca}2.3$  was crucial to block by  $[H^+]_o$ . (A) Sequence alignment of predicted outer pore region that spans the S5-P helix-SF-S6 of  $K_{Ca}2.2$  and  $K_{Ca}2.3$ , with the single H residue in  $K_{Ca}2.2$  and the two H residues in the pore of  $K_{Ca}2.3$  highlighted. (B) Schematic representation of the location of the highlighted residues in  $K_{Ca}2.2$  (H337 and N368) and  $K_{Ca}2.3$  (H491 and H522). (C) Homology model of the pore region S5-P helix-SF-S6 of  $K_{Ca}2.2$  displaying two subunits of the channel tetramer with proposed positions of the H and N residues labeled and represented in space-filled mode. Representative (D)  $K_{Ca}2.2(H337N)$  and (E)  $K_{Ca}2.3(H491N)$  outside-out patch currents evoked by a voltage ramp from  $-100$  to  $+100$  mV. Both channel mutants were poorly sensitive to inhibition by extracellular pH 5.5. (F) The concentration–inhibition relationships of currents measured at  $-60$  mV of  $K_{Ca}2.2(H337N)$ ,  $K_{Ca}2.3(H491N)$ , and  $K_{Ca}2.2(H337N, N368H)$ . The sensitivity of wild-type currents is shown for comparison.

conductance states of wild-type  $K_{Ca2.2}$  channels of  $10.8 \pm 1.4$  pS (Fig. 2 A) ( $P = 0.94$ ;  $n = 3$ ), with a small but significant difference between the conductance of the mutant and the wild-type channel extracellular pH 5.9 ( $9.63 \pm 0.07$  pS;  $P < 0.02$ ;  $n = 3$ ). These data suggested that an uncharged basic H residue in the outer pore of  $K_{Ca2}$  channels was required to maintain a high conductance state configuration of the pore. This proposal was supported by finding that mutation of H337 to the positively charged arginine residue (H337R) produced a channel whose conductance was estimated by nonstationary noise to be  $11.9 \pm 1.9$  pS ( $n = 6$ ; not depicted), a conductance significantly different from wild-type  $K_{Ca2.2}$  channels ( $P < 0.05$ ).

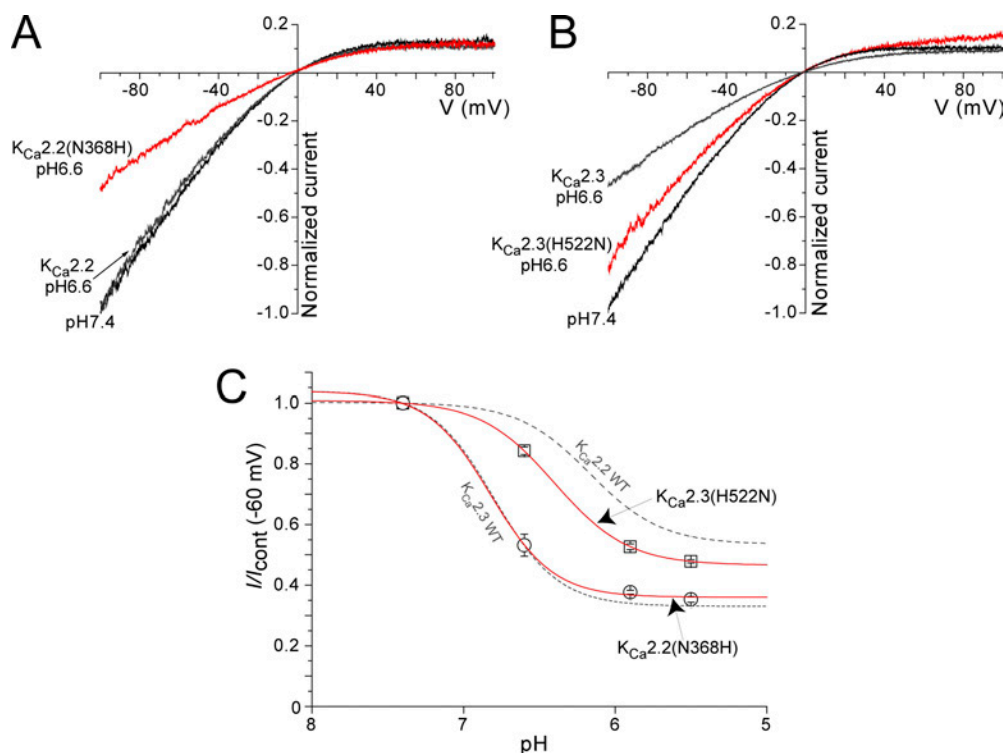
The presence of a second H residue in the pore region of  $K_{Ca2.3}$  conferred extra sensitivity to  $[H^+]_o$ .

It was postulated that the additional histidine residue (H522) located in the outer pore region of  $K_{Ca2.3}$ , but not  $K_{Ca2.2}$ , was responsible for the higher sensitivity of  $K_{Ca2.3}$  current to extracellular protons. This was tested by mutating the outer pore regions of both  $K_{Ca2.2}$  and  $K_{Ca2.3}$  to mimic the sibling's pore. Therefore, N368 in  $K_{Ca2.2}$  was mutated to a histidine (N368H) to mimic the  $K_{Ca2.3}$  pore ( $K_{Ca2.2}$ (N368H)), and H522 in  $K_{Ca2.3}$  was mutated to asparagine (H522N) to mimic the  $K_{Ca2.2}$  pore ( $K_{Ca2.3}$ (H522N)). Both mutants produced functional

current with properties consistent with  $K_{Ca2}$  channel current (Fig. 7, A and B). The application of extracellular pH 6.6 to  $K_{Ca2.2}$ (N368H) showed a greater inhibition than wild-type  $K_{Ca2.2}$  (Fig. 7 A). Conversely,  $K_{Ca2.3}$ (H522N) was less sensitive to extracellular protons than wild-type  $K_{Ca2.3}$  current (Fig. 7 B). The generation of concentration–inhibition relationships for both mutants showed that  $K_{Ca2.2}$ (N368H) ( $n = 5$ ) displayed a sensitivity to extracellular protons that mirrored ( $P = 0.91$ ) wild-type  $K_{Ca2.3}$  current ( $n = 11$ ) ( $pIC_{50}$  of  $\sim 6.9$ ), shifting the  $pIC_{50}$  of  $K_{Ca2.2}$ (N368H) to 6.8 from 6.2 of wild-type  $K_{Ca2.2}$  (Fig. 7 C). In contrast, the sensitivity of  $K_{Ca2.3}$ (H522N) to protons was significantly reduced ( $P < 0.0001$ ;  $n = 3$ ) ( $pIC_{50}$  of  $\sim 6.4$ ) when compared with wild-type  $K_{Ca2.3}$  current ( $pIC_{50}$  of  $\sim 6.9$ ) (Fig. 7 C). These data strongly suggested that H522 in the outer pore region of  $K_{Ca2.3}$  was responsible for the higher sensitivity to extracellular protons displayed by the channel.

The histidine–proton interaction sites do not form a high affinity  $Zn^{2+}$  binding site

Zinc ions ( $Zn^{2+}$ ) bind to histidine and cysteine residues that are in specific conformations with a high affinity (Vallee and Auld, 1990). This binding has been shown to mimic the effects of extracellular protons interacting with H residues in voltage-gated  $K^+$  channels



**Figure 7.** The second H residue within the outer pore region of  $K_{Ca2.3}$  conferred extra sensitivity to  $[H^+]_o$ . (A) Ramp currents of wild-type  $K_{Ca2.2}$  and the mutant  $K_{Ca2.2}$ (N368H) to mimic the outer pore sequence of  $K_{Ca2.3}$  (in extracellular pH 7.4) were normalized to the maximum current at pH 7.4. The addition of extracellular pH 6.6 to wild-type  $K_{Ca2.2}$  and the mutant  $K_{Ca2.2}$ (N368H) evoked no inhibition of wild-type current, but significant block of the mutant. (B) Mutation of the second H residue in  $K_{Ca2.3}$  produced a channel current that was poorly sensitive to extracellular pH 6.6 when compared with the wild-type channel current. (C) The concentration–inhibition relationship for wild-type  $K_{Ca2.2}$  and  $K_{Ca2.3}$  currents, and mutants  $K_{Ca2.2}$ (N368H) and  $K_{Ca2.3}$ (H522N) currents by extracellular acidosis. Channel

currents were measured at  $-60$  mV and fitted with the Hill equation to yield the following:  $K_{Ca2.2}$ (N368H),  $IC_{50} = 160 \pm 33$  nM and  $pIC_{50} = 6.8$ ;  $n = -2.13 \pm 0.08$  (reflecting the increased sensitivity to  $[H^+]_o$  compared with  $K_{Ca2.2}$ ,  $pIC_{50} = 6.16$ ); and  $K_{Ca2.3}$ (H522N),  $IC_{50} = 688 \pm 28$  nM and  $pIC_{50} = 6.43$ ;  $n = 2.08 \pm 0.16$  fit (showing the reduced sensitivity to  $[H^+]_o$  when compared with  $K_{Ca2.3}$ ,  $pIC_{50} = 6.8$ ) ( $n = 3-5$ ).

(Kehl et al., 2002). The effect of extracellular  $Zn^{2+}$  on the  $K_{Ca2.2}$  channel current was tested to determine whether the outer pore H residue could act as a binding site of the divalent cation. The  $K_{Ca2.2}$  current was not significantly inhibited at  $-60$  mV by  $Zn^{2+}$  (4.5 mM), whereas  $K_{Ca2.3}$  was significantly inhibited  $38 \pm 3.4\%$  ( $P < 0.01$ ) (Fig. 8, A and B). The difference in sensitivity between channel subtypes resulted from H522 in  $K_{Ca2.3}$ , as  $K_{Ca2.2}$ (N368H) showed an increased sensitivity ( $26.9 \pm 2.9\%$  block by 4.5 mM  $Zn^{2+}$ ;  $P < 0.01$ ) (Fig. 8 C) and  $K_{Ca2.3}$ (H522N) showed a significant reduction in block compared with the wild-type channel ( $0.4 \pm 2.5\%$  block by 4.5 mM  $Zn^{2+}$ ;  $P < 0.001$ ) (Fig. 8 D). These data suggest that  $Zn^{2+}$  could not coordinate at the H337/H498 residue, located in the outer pore between the S5-P helix, but could access and interfere with conduction by binding to the H in the pore at the SF-S6 segment (H522 in  $K_{Ca2.3}$ ) with very low affinity.

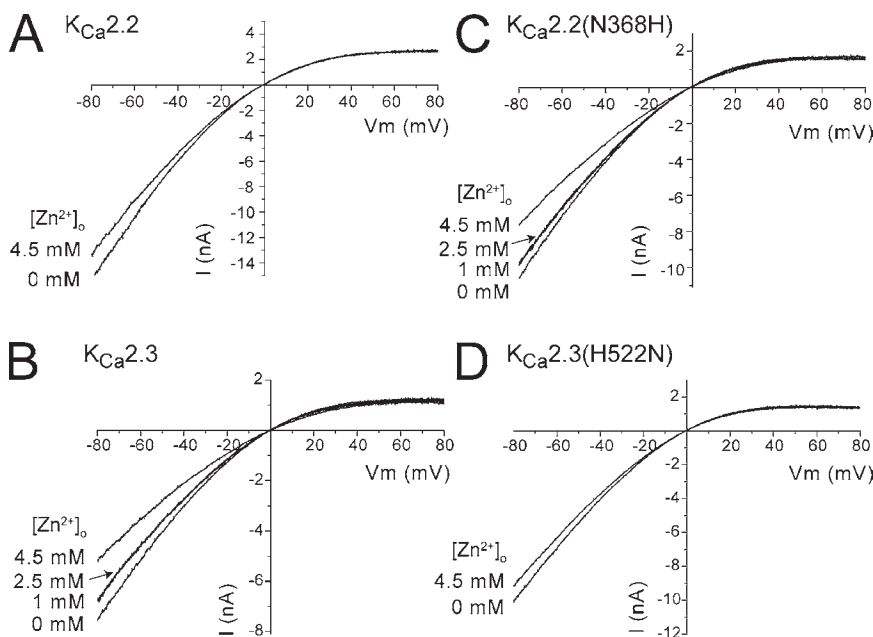
#### Extracellular $[H^+]_o$ shifted inward rectification of $K_{Ca2.3}$ current to more depolarized potentials

The inhibition of macroscopic current by  $[H^+]_o$  was voltage dependent, with less inhibition observed for outward current evoked positive to 0 mV (Fig. 1, A and B). However, resolving the inhibition of outward current was difficult to achieve because of the small amplitude and clear rectification that was observed under high  $K^+$  conditions. The inhibition of both  $K_{Ca2.2}$  and  $K_{Ca2.3}$  current by extracellular protons was also observed in low  $K^+$ .  $K_{Ca2.2}$  and  $K_{Ca2.3}$  current recorded under low  $K^+$  conditions showed clear inward rectification at membrane potentials positive to 0 mV. The application of extracellular protons inhibited both current types, but it also shifted the onset of inward rectification to more depolarized levels for the  $K_{Ca2.3}$  current (Fig. 9,

A and B). The concentration–inhibition relationships for the two channel subtypes showed that the sensitivity of current to protons was reduced in low  $K^+$ , with a shift of  $pIC_{50}$  of 6.2 in high  $K^+$  to 5.6 in low  $K^+$  for  $K_{Ca2.2}$ , and from  $pIC_{50}$  from 6.8 to 6.6 in  $K_{Ca2.3}$  (Fig. 9 C). The small amplitude of the  $K_{Ca2.2}$  current in outside-out patches made it unsuitable to obtain  $pIC_{50}$  values from individual experiments, with the fit being imposed onto mean data. This prevented the determination of significance of the shift in sensitivity of the  $K_{Ca2.2}$  current to protons between high and low  $K^+$ . However, the shift in sensitivity was significant for the  $K_{Ca2.3}$  current ( $P < 0.002$ ;  $n = 6-11$ ).

It was clear that current inhibition was associated with a shift in inward rectification, especially for  $K_{Ca2.3}$ -mediated current (Fig. 9, A and B). The apparent voltage dependence of the rectification was characterized using a modified Goldman-Hodgkin-Katz (GHK) current equation.  $K_{Ca2}$  channel currents do not display voltage dependence (Hirschberg et al., 1998), with inward rectification arising from block by intracellular  $Mg^{2+}$  ions (Soh and Park, 2001). Furthermore,  $K_{Ca2}$  currents approach pure GHK rectification in the absence of intracellular  $Mg^{2+}$  (Soh and Park, 2001). Therefore, the current–voltage relationships of both  $K_{Ca2.2}$  and  $K_{Ca2.3}$  currents should follow the predicted deviation from the GHK equation due to rectification by internal divalent cations, including a term that describes the voltage dependence of block (Woodhull, 1973) by intracellular cations (Pusch, 1990) (Eq. 3):

$$I = P \frac{VF^2 [K^+]_i - [K^+]_o \exp\left(\frac{-FV}{RT}\right)}{1 - \exp\left(\frac{-FV}{RT}\right)} \cdot \frac{1}{1 + \frac{[Mg^{2+}]_i}{Mg^{2+} K_d(0mV) \exp\left(\frac{-\delta z FV}{RT}\right)}} \quad (3)$$



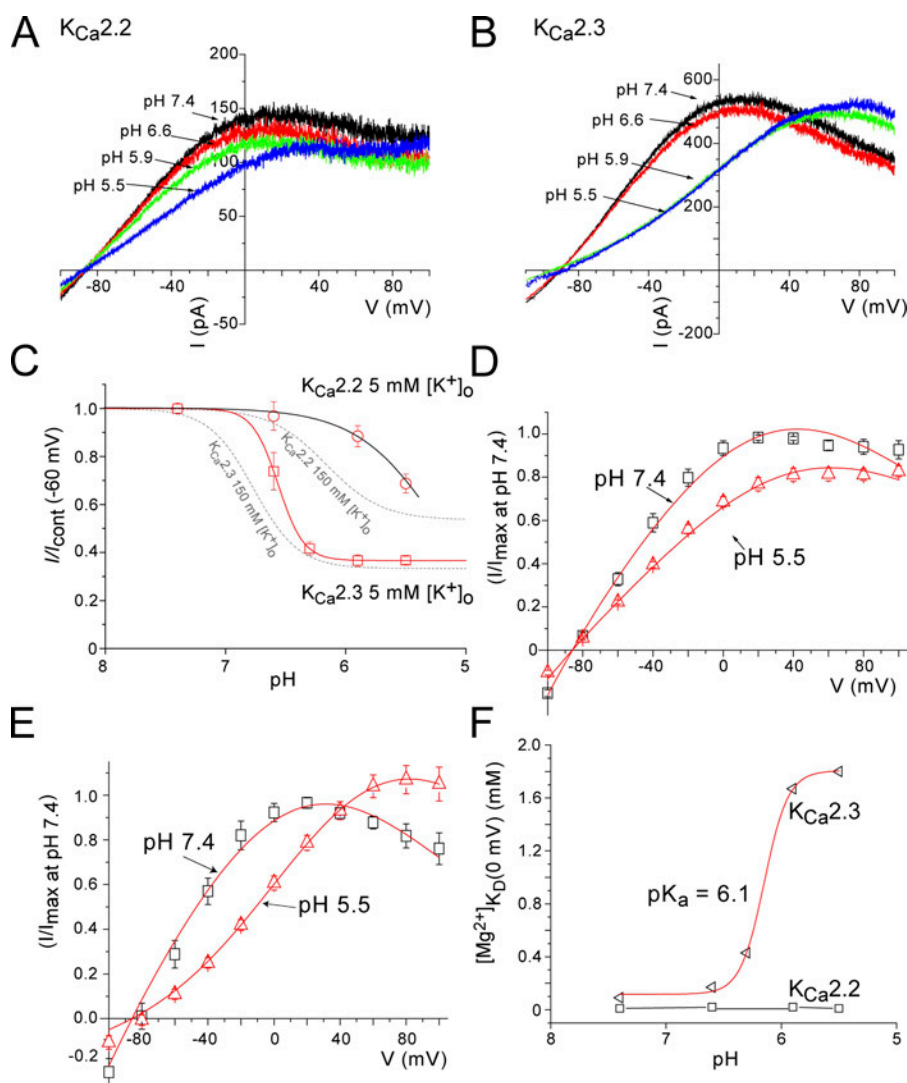
**Figure 8.** Extracellular  $Zn^{2+}$  accesses only the second H residue in  $K_{Ca2.3}$  to cause moderate block. Representative whole cell currents of (A)  $K_{Ca2.2}$  and (B)  $K_{Ca2.3}$  channels evoked by voltage ramps from  $-80$  to  $+80$  mV under increasing concentrations of extracellular  $Zn^{2+}$ .  $K_{Ca2.3}$  current was more sensitive to block by  $Zn^{2+}$  than  $K_{Ca2.2}$ . (C) Representative currents of the mutant  $K_{Ca2.2}$ (N368H) showing an increased sensitivity to  $Zn^{2+}$  compared with  $K_{Ca2.2}$ . (D) Showing the reduced sensitivity to  $Zn^{2+}$  of the mutant  $K_{Ca2.3}$ (H522N), a mutation to mimic the  $K_{Ca2.2}$  pore sequence that lacked the second H found in  $K_{Ca2.3}$ .



where  $^{Mg}K_d(0\text{ mV})$  is the apparent equilibrium dissociation constant for  $Mg^{2+}$  at 0 mV. The effect of  $[Mg^{2+}]_i$  is represented as a first-order blocking mechanism dependent on voltage, whereas the fit parameter  $^{Mg}K_d(0\text{ mV})$  is a measure of the degree of rectification with higher affinity values correlating with a stronger rectification. Fig. 9 D shows that the mean normalized currents for  $K_{Ca}2.2$  measured every 20 mV at pH 7.4 and 5.5 were well described by Eq. 3 (the intermediate external pH data points are left out for clarity), revealing that extracellular protons had little effect on  $\delta$  (0.19 at pH 7.4 compared with 0.16 at 5.5) or  $^{Mg}K_d(0\text{ mV})$  ( $\sim 0.01\text{ mM}$ ). This suggests that the interaction of protons with  $K_{Ca}2.2$  channels has little impact on the  $Mg^{2+}$  binding site and consequent rectification. Fitting the normalized  $K_{Ca}2.3$  currents at pH 7.4 and 5.5 with Eq. 3 showed that extracellular protons had little effect on  $\delta$ , but the  $^{Mg}K_d(0\text{ mV})$  shifted from  $\sim 0.15\text{ mM}$  in pH 7.4 to 1.8 mM in pH 5.5

(Fig. 9 E). These results suggest that proton binding to  $K_{Ca}2.3$  channels reduces the affinity of  $Mg^{2+}$  binding to the rectification site without shifting the position of the site within the membrane field.

It has been proposed that rectifying divalent cations bind to serine 359 in  $K_{Ca}2.2$  channels, which is located at the intracellular mouth of the selectivity filter (Soh and Park, 2002). It is possible that protons might conduct through  $K_{Ca}2.3$  channels and compete with intracellular  $Mg^{2+}$  ions for rectification. Values for  $^{Mg}K_d(0\text{ mV})$  obtained from the fitting of Eq. 3 across the pH range (7.4–5.5) vary with pH and are fitted by the Hill equation with a  $pIC_{50}$  of 6.1 (Fig. 9 F). This  $pIC_{50}$  is similar to the  $pK_a$  of a histidine residue in solution as a single amino acid, which might suggest that the increase in  $^{Mg}K_d(0\text{ mV})$  is mediated through a titration of a histidine exposed to the extracellular solution by protons, and not by direct competition with  $Mg^{2+}$  for the rectification site.



**Figure 9.** Extracellular  $[H^+]_o$  shifts the inward rectification of  $K_{Ca}2.3$  to more depolarized potentials. Representative outside-out macropatch (A)  $K_{Ca}2.2$  and (B)  $K_{Ca}2.3$  currents in low  $K^+$  in the presence of increasing concentrations of  $[H^+]_o$ . Decreasing extracellular pH inhibited both current subtypes, with a shift of inward rectification apparent for the  $K_{Ca}2.3$  current. (C) Concentration-inhibition relationships for  $K_{Ca}2.2$  and  $K_{Ca}2.3$  currents measured at  $-60\text{ mV}$  in both low  $K^+$  ( $5\text{ mM } [K^+]_o$ ) and high  $K^+$  ( $150\text{ mM } [K^+]_o$ ), showing that both  $K_{Ca}2.2$  and  $K_{Ca}2.3$  currents were less sensitive to  $[H^+]_o$  in low  $K^+$ . Individual patches were fit with Eq. 1 to yield the following:  $K_{Ca}2.3$ ,  $IC_{50} = 269 \pm 16\text{ nM}$  and  $pIC_{50} = 6.6$ ;  $n = -5.5 \pm 0.16$  ( $n = 3-6$ ).  $K_{Ca}2.2$  current was very small at  $-60\text{ mV}$ , only allowing mean data to be fitted, yielding the following:  $pIC_{50} = 5.6$ ;  $n_h = -1.88$  ( $n = 4$ ). The shift in the onset of rectification was illustrated fitting normalized currents with Eq. 3 for (D)  $K_{Ca}2.2$ : pH 7.4,  $\delta = 0.19$ , and  $^{Mg}K_d(0\text{ mV}) = 0.01\text{ mM}$ , and pH 5.5,  $\delta = 0.16$ , and  $^{Mg}K_d(0\text{ mV}) = 0.01\text{ mM}$ , showing no effect on the affinity for the rectifying divalent ion by increasing  $[H^+]_o$ , and (E)  $K_{Ca}2.3$ : pH 7.4,  $\delta = 0.22$ , and  $^{Mg}K_d(0\text{ mV}) = 0.09\text{ mM}$ , and pH 5.5,  $\delta = 0.20$ , and  $^{Mg}K_d(0\text{ mV}) = 1.8\text{ mM}$ , showing a reduced affinity for intracellular divalent ions to evoke inward rectification at acidic extracellular pH. (F) The values of  $^{Mg}K_d(0\text{ mV})$  from the fits of Eq. 3 over the full range of  $[H^+]_o$  were plotted against pH and fitted with the Hill equation to give for  $pIC_{50} = 6.14$  and  $n_h = 4.2$  for  $K_{Ca}2.3$ , whereas  $K_{Ca}2.2$  showed no shift in  $^{Mg}K_d(0\text{ mV})$ .

In addition, it suggests that the shift in rectification of the  $K_{Ca2.3}$  current observed in low  $K^+$  by lowering extracellular pH might result from protons interacting with the H522 that is unique to  $K_{Ca2.3}$  (Fig. 6 A).

## DISCUSSION

The presented data demonstrated that the protonation of an outer pore H residue common to both  $K_{Ca2}$  channel subtypes mediated inhibition of macroscopic current. Extracellular acidification or mutation of the H residue did not affect channel activation by  $Ca^{2+}$ , indicating that protonation or mutation did not affect the structural requirements for gating. Inhibition of current was principally mediated by a decrease in single-channel conductance, associated with a depolarizing shift in current rectification in  $K_{Ca2.3}$ , and to a lesser extent in  $K_{Ca2.2}$ . This shift in rectification was produced by a reduction in the affinity of intracellular divalent ions for their proposed intracellular binding site (Soh and Park, 2002). These data indicated that the protonated outer pore H522 in  $K_{Ca2.3}$  could be in the local electrostatic vicinity of the intracellular binding site (S359) for intracellular  $Mg^{2+}$  ions. Sensitivity to extracellular protons required the outer pore H residue common to both  $K_{Ca2}$  channel subtypes, even though  $K_{Ca2.3}$  possesses the additional H residue (H522). This was supported by the finding that the double-mutant  $K_{Ca2.2}$ (H337N, N368H) was also poorly sensitive to protons. This suggests that the first H residue acts to provide a specific molecular conformation that allows the second H to interact with protons to produce a shift in the rectification of  $K_{Ca2.3}$ . Finally, it was observed that  $K_{Ca2.3}$ (H522N) (a mutation to mimic the outer pore of  $K_{Ca2.2}$ ) was more sensitive to extracellular protons than wild-type  $K_{Ca2.2}$ . This might suggest subtle differences in pore structure between the two wild-type channels.

It has been proposed that the pore structure of  $K_{Ca2}$  channels shares close structural homology to Kv channels (Jäger and Grissmer, 2004). Superimposition of the pore sequence onto the crystal structure of Kv1.2 (Doyle et al., 1998; Long et al., 2005) suggested that H337 in  $K_{Ca2.2}$  (within the S5-P helix loop) is a substantial distance away from the ion conduction pathway (Fig. 6 C). This would make it highly unlikely that the channel is subject to a direct occlusion/pore block by protonation of H337 (H491 in  $K_{Ca2.3}$ ), and also unlikely to significantly electrostatically influence the conduction pathway. In addition, we observed that lowering external  $K^+$  significantly reduced the sensitivity to proton inhibition, which is contrary to the competitive interaction with  $K^+$  that would be expected if the H residue formed any part of the conduction pathway (Kehl et al., 2002; Fedida et al., 2005). This lack of competition also suggested that outer pore collapse (C-type inactivation),

which is seen in Kv channels as the mechanism underlying inhibition, was not the mechanism for inhibition of  $K_{Ca2}$  current, as this would also be antagonized by high  $K^+$  (Baukowitz and Yellen, 1995). It seems likely that inhibition of macroscopic current in  $K_{Ca2.2}$  results from an indirect structural perturbation of the channel outer pore through H337 protonation. The protonation of H337 could change the local salt bridges and hydrogen bonds (Thompson et al., 2008) in a manner that couples to the structure of the conduction pathway. This allosteric effect could cause a change in pore shape resulting in lowered single-channel conductance, as the wild-type channel with H positively charged only displayed a conductance of  $\sim 11$  pS, without affecting open-state kinetics. This hypothesis is supported by the reduced single-channel conductance that we observed for the  $K_{Ca2.2}$ (H337N) mutant channel. This is consistent with the proposal that a nonprotonated H residue is necessary for maintaining a pore shape that permits high conductance openings, a pore shape not supported by a neutral or a positively charged amino acid. In  $K_{Ca2.3}$ , the extra sensitivity to protons is likely affected by the combination of structural perturbation through the protonation of S5-P helix H491 and the additional protonation of H522 causing further potential structural and electrostatic impairments to  $K^+$  flux. Molecular modeling studies examining electrostatic interactions have supported experimental evidence that protonation of H residues in the outer pore perturb the electrostatic interactions of  $K^+$  ions as they travel through the pore (Liu et al., 2007). The closer proximity of H522 than H491 to the  $K_{Ca2.3}$  pore mouth might suggest that protonation of H522 could also contribute to inhibition through an electrostatic repulsion of  $K^+$  in the outer pore region and conduction pathway.

The inhibition by protons displayed an apparent voltage dependence with less block at depolarized membrane potentials, an effect most pronounced for  $K_{Ca2.3}$  current in low  $K^+$ . The fraction of inhibition at different voltages as a function of extracellular pH could not be fully described by the Woodhull model, which depicts a simple block of the permeation pathway by a charged ion (Woodhull, 1973). This might not be surprising, considering the arguments against protons acting as pore blockers discussed above. The lack of primary voltage dependence is also consistent with the prediction that both H residues would occupy positions in the outer pore region in areas not considered to be directly within the membrane field. We propose that protonated H522 interacted with the intracellular rectifying  $Mg^{2+}$  that is bound within the membrane field (Soh and Park, 2001). The affinity of the block by intracellular divalent ions to cause rectification varies with transmembrane voltage,  $[Ca^{2+}]_i$ , and  $[K^+]_o$ , suggesting the blocking ion is located in the conduction pathway (Soh and Park,

2001). To account for this, the currents were fit with a GHK equation modified to account for the voltage dependence of block by intracellular ions (Eq. 3) (Pusch, 1990). Our results suggested that the apparent voltage dependence of block by protons in  $K_{Ca2.3}$  is a result of reducing affinity of intracellular divalent ions for the rectification binding site, with the estimated  $MgK_d(0 \text{ mV})$  from the fit shifting from 0.1 mM at pH 7.4 to 1.8 mM at pH 5.5. The electrical distance  $\delta$  stayed about the same at  $\sim 0.2$ , suggesting that the location of the binding site in the field was not significantly shifted. The protonation-dependent change in pore shape, in addition to an electrostatic repulsive effect originating from the protonated H522, might perturb the configuration of the binding site for the divalent ion and lower affinity. Finally, the shift in rectification caused by extracellular protons was more pronounced in low  $K^+$  than high  $K^+$ . It has been reported that increasing  $[K^+]_o$  lowers the apparent affinity of the  $Mg^{2+}$  for the intracellular binding site through a mechanism commonly referred to as “*trans*-Knockoff” (Soh and Park, 2001). This proposal is consistent with the shift of rectification being more pronounced when the affinity for rectifying ions is higher (e.g., in low  $K^+$ ). It is likely that the pore shape differs between  $K_{Ca2.2}$  and  $K_{Ca2.3}$  channels, which partly underlies the different sensitivity to extracellular protons. It is noteworthy that acidic pH is the only condition described so far that clearly inhibits  $K_{Ca2.3}$  more than  $K_{Ca2.2}$  channel currents. This knowledge may give hints for the development of future preferential  $K_{Ca2.3}$  channel blockers.

Transient changes in extracellular pH occur during periods of physiological neuronal activity, such as synaptic activation (Chesler, 1990) and pathological events, such as epileptic seizures and cerebral ischemia (Chesler and Kaila, 1992; Tombaugh and Sapolsky, 1993), falling to below pH 6.5 during ischemia (von Hanwehr et al., 1986). Inhibition by acidosis would have effects dictated by channel subunit location.  $K_{Ca2.2}$  and  $K_{Ca2.3}$  channel subunits display distinct but overlapping expression patterns in the brain (Sailer et al., 2002, 2004). For example,  $K_{Ca2.2}$  and  $K_{Ca2.3}$  subunits are present in the hippocampus, with  $K_{Ca2.2}$  present in dendrites and dendritic spines and  $K_{Ca2.3}$  subunits localized in mossy fiber terminals (Sailer et al., 2002, 2004; Lin et al., 2008). Inhibition of spine-located  $K_{Ca2.2}$  channel current during synaptic activation would aid the induction of long-term potentiation (Lin et al., 2008), whereas inhibition of channel current located in dendrites would increase excitability (Kelly and Church, 2004). In contrast, the inhibition of mossy fiber terminal  $K_{Ca2.3}$  channel current would affect transmitter release and the induction of long-term potentiation at that synapse. It is clear that the differences in proton modulation of these channels could reflect a functionally relevant separation that might contribute to the physiological roles of the  $K_{Ca2}$  channel subtypes in different brain regions.

We wish to thank Mr. Guillaume Drion, Prof. Andy Randall, and Dr. Jon Brown for helpful discussions on data analysis.

This work was funded by a grant from the Belgian Science Policy (IAP 6/31 to V. Seutin and N.V. Marrion). V. Seutin was also supported by grant 9.4560.03 from The National Fund for Scientific Research (Belgium). C. Lamy was supported by a FIRST-DEI grant (516131) from the Walloon region of Belgium.

Christopher Miller served as editor.

Submitted: 28 April 2009

Accepted: 11 September 2009

## REFERENCES

- Baukowitz, T., and G. Yellen. 1995. Modulation of  $K^+$  current by frequency and external  $[K^+]$ : a tale of two inactivation mechanisms. *Neuron*. 15:951–960. doi:10.1016/0896-6273(95)90185-X
- Chesler, M. 1990. The regulation and modulation of pH in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* 34:401–427. doi:10.1016/0301-0082(90)90034-E
- Chesler, M., and K. Kaila. 1992. Modulation of pH by neuronal activity. *Trends Neurosci.* 15:396–402. doi:10.1016/0166-2236(92)90191-A
- Claydon, T.W., M.R. Boyett, A. Sivaprasadarao, K. Ishii, J.M. Owen, H.A. O’Beirne, R. Leach, K. Komukai, and C.H. Orchard. 2000. Inhibition of the  $K^+$  channel kv1.4 by acidosis: protonation of an extracellular histidine slows the recovery from N-type inactivation. *J. Physiol.* 526:253–264. doi:10.1111/j.1469-7793.2000.00253.x
- Cohen, A., Y. Ben-Abu, S. Hen, and N. Zilberberg. 2008. A novel mechanism for human K2P2.1 channel gating. Facilitation of C-type gating by protonation of extracellular histidine residues. *J. Biol. Chem.* 283:19448–19455. doi:10.1074/jbc.M801273200
- Combet, C., M. Jambon, G. Deléage, and C. Geourjon. 2002. Geno3D: automatic comparative molecular modelling of protein. *Bioinformatics.* 18:213–214. doi:10.1093/bioinformatics/18.1.213
- Coulter, K.L., F. Périer, C.M. Radeke, and C.A. Vandenberg. 1995. Identification and molecular localization of a pH-sensing domain for the inward rectifier potassium channel HIR. *Neuron*. 15:1157–1168. doi:10.1016/0896-6273(95)90103-5
- Dilly, S., A. Graulich, A. Farce, V. Seutin, J.F. Liegeois, and P. Chavatte. 2005. Identification of a pharmacophore of SKCa channel blockers. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 20:517–523. doi:10.1080/14756360500210989
- Doyle, D.A., J. Morais Cabral, R.A. Pfuetzner, A. Kuo, J.M. Gulbis, S.L. Cohen, B.T. Chait, and R. MacKinnon. 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of  $K^+$  conduction and selectivity. *Science*. 280:69–77. doi:10.1126/science.280.5360.69
- Fedida, D., S. Zhang, D.C. Kwan, C. Eduljee, and S.J. Kehl. 2005. Synergistic inhibition of the maximum conductance of Kv1.5 channels by extracellular  $K^+$  reduction and acidification. *Cell Biochem. Biophys.* 43:231–242. doi:10.1385/CBB:43:2:231
- Geiger, D., D. Becker, B. Lacombe, and R. Hedrich. 2002. Outer pore residues control the  $H^+$  and  $K^+$  sensitivity of the Arabidopsis potassium channel AKT3. *Plant Cell*. 14:1859–1868. doi:10.1105/tpc.003244
- Hartveit, E., and M.L. Veruki. 2007. Studying properties of neurotransmitter receptors by non-stationary noise analysis of spontaneous postsynaptic currents and agonist-evoked responses in outside-out patches. *Nat. Protoc.* 2:434–448. doi:10.1038/nprot.2007.47
- Hirschberg, B., J. Maylie, J.P. Adelman, and N.V. Marrion. 1998. Gating of recombinant small-conductance Ca-activated  $K^+$  channels by calcium. *J. Gen. Physiol.* 111:565–581. doi:10.1085/jgp.111.4.565
- Jäger, H., and S. Grissmer. 2001. Regulation of a mammalian Shaker-related potassium channel, hKv1.5, by extracellular potassium and pH. *FEBS Lett.* 488:45–50. doi:10.1016/S0014-5793(00)02396-6



- Jäger, H., and S. Grissmer. 2004. Characterization of the outer pore region of the apamin-sensitive Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel rSK2. *Toxicol.* 43:951–960. doi:10.1016/j.toxicol.2004.03.025
- Kehl, S.J., C. Eduljee, D.C. Kwan, S. Zhang, and D. Fedida. 2002. Molecular determinants of the inhibition of human Kv1.5 potassium currents by external protons and Zn<sup>2+</sup>. *J. Physiol.* 541:9–24. doi:10.1113/jphysiol.2001.014456
- Kelly, T., and J. Church. 2004. pH modulation of currents that contribute to the medium and slow afterhyperpolarizations in rat CA1 pyramidal neurones. *J. Physiol.* 554:449–466. doi:10.1113/jphysiol.2003.051607
- Köhler, M., B. Hirschberg, C.T. Bond, J.M. Kinzie, N.V. Marrion, J. Maylie, and J.P. Adelman. 1996. Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. *Science.* 273:1709–1714. doi:10.1126/science.273.5282.1709
- Kwan, D.C., D. Fedida, and S.J. Kehl. 2006. Single channel analysis reveals different modes of Kv1.5 gating behavior regulated by changes of external pH. *Biophys. J.* 90:1212–1222. doi:10.1529/biophysj.105.068577
- Lin, M.T., R. Luján, M. Watanabe, J.P. Adelman, and J. Maylie. 2008. SK2 channel plasticity contributes to LTP at Schaffer collateral-CA1 synapses. *Nat. Neurosci.* 11:170–177. doi:10.1038/nn2041
- Liu, B., D.R. Westhead, M.R. Boyett, and J. Warwicker. 2007. Modelling the pH-dependent properties of Kv1 potassium channels. *J. Mol. Biol.* 368:328–335. doi:10.1016/j.jmb.2007.02.041
- Long, S.B., E.B. Campbell, and R. Mackinnon. 2005. Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K<sup>+</sup> channel. *Science.* 309:897–903. doi:10.1126/science.1116269
- Prole, D.L., P.A. Lima, and N.V. Marrion. 2003. Mechanisms underlying modulation of neuronal KCNQ2/KCNQ3 potassium channels by extracellular protons. *J. Gen. Physiol.* 122:775–793. doi:10.1085/jgp.200308897
- Pusch, M. 1990. Open-channel block of Na<sup>+</sup> channels by intracellular Mg<sup>2+</sup>. *Eur. Biophys. J.* 18:317–326.
- Sailer, C.A., H. Hu, W.A. Kaufmann, M. Trieb, C. Schwarzer, J.F. Storm, and H.G. Knaus. 2002. Regional differences in distribution and functional expression of small-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in rat brain. *J. Neurosci.* 22:9698–9707.
- Sailer, C.A., W.A. Kaufmann, J. Marksteiner, and H.G. Knaus. 2004. Comparative immunohistochemical distribution of three small-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channel subunits, SK1, SK2, and SK3 in mouse brain. *Mol. Cell. Neurosci.* 26:458–469. doi:10.1016/j.mcn.2004.03.002
- Shakkottai, V.G., I. Regaya, H. Wulff, Z. Fajloun, H. Tomita, M. Fathallah, M.D. Cahalan, J.J. Gargus, J.M. Sabatier, and K.G. Chandy. 2001. Design and characterization of a highly selective peptide inhibitor of the small conductance calcium-activated K<sup>+</sup> channel, SkCa<sub>2</sub>. *J. Biol. Chem.* 276:43145–43151. doi:10.1074/jbc.M106981200
- Sigworth, F.J. 1980. The variance of sodium current fluctuations at the node of Ranvier. *J. Physiol.* 307:97–129.
- Soh, H., and C.S. Park. 2001. Inwardly rectifying current-voltage relationship of small-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels rendered by intracellular divalent cation blockade. *Biophys. J.* 80:2207–2215. doi:10.1016/S0006-3495(01)76193-0
- Soh, H., and C.S. Park. 2002. Localization of divalent cation-binding site in the pore of a small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel and its role in determining current-voltage relationship. *Biophys. J.* 83:2528–2538. doi:10.1016/S0006-3495(02)75264-8
- Steidl, J.V., and A.J. Yool. 1999. Differential sensitivity of voltage-gated potassium channels Kv1.5 and Kv1.2 to acidic pH and molecular identification of pH sensor. *Mol. Pharmacol.* 55:812–820.
- Stocker, M., and P. Pedarzani. 2000. Differential distribution of three Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel subunits, SK1, SK2, and SK3, in the adult rat central nervous system. *Mol. Cell. Neurosci.* 15:476–493. doi:10.1006/mcne.2000.0842
- Stocker, M., K. Hirzel, D. D'hoedt, and P. Pedarzani. 2004. Matching molecules to function: neuronal Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels and afterhyperpolarizations. *Toxicol.* 43:933–949. doi:10.1016/j.toxicol.2003.12.009
- Thompson, A.N., D.J. Posson, P.V. Parsa, and C.M. Nimigean. 2008. Molecular mechanism of pH sensing in KcsA potassium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105:6900–6905. doi:10.1073/pnas.0800873105
- Tombaugh, G.C., and R.M. Sapolsky. 1993. Evolving concepts about the role of acidosis in ischemic neuropathology. *J. Neurochem.* 61:793–803. doi:10.1111/j.1471-4159.1993.tb03589.x
- Ureche, O.N., R. Baltaev, L. Ureche, N. Strutz-Seebohm, F. Lang, and G. Seebohm. 2008. Novel insights into the structural basis of pH-sensitivity in inward rectifier K<sup>+</sup> channels Kir2.3. *Cell. Physiol. Biochem.* 21:347–356. doi:10.1159/000129629
- Vallee, B.L., and D.S. Auld. 1990. Active-site zinc ligands and activated H<sub>2</sub>O of zinc enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:220–224. doi:10.1073/pnas.87.1.220
- von Hanwehr, R., M.L. Smith, and B.K. Siesjö. 1986. Extra- and intracellular pH during near-complete forebrain ischemia in the rat. *J. Neurochem.* 46:331–339. doi:10.1111/j.1471-4159.1986.tb12973.x
- Woodhull, A.M. 1973. Ionic blockage of sodium channels in nerve. *J. Gen. Physiol.* 61:687–708. doi:10.1085/jgp.61.6.687
- Xia, X.M., B. Fakler, A. Rivard, G. Wayman, T. Johnson-Pais, J.E. Keen, T. Ishii, B. Hirschberg, C.T. Bond, S. Lutsenko, et al. 1998. Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature.* 395:503–507. doi:10.1038/26758

# Allosteric Block of $K_{Ca}2$ Channels by Apamin\*

Received for publication, February 3, 2010, and in revised form, May 27, 2010. Published, JBC Papers in Press, June 18, 2010, DOI 10.1074/jbc.M110.110072

Cédric Lamy<sup>†1</sup>, Samuel J. Goodchild<sup>§1</sup>, Kate L. Weatherall<sup>§</sup>, David E. Jane<sup>§</sup>, Jean-François Liégeois<sup>1,2</sup>, Vincent Seutin<sup>†3</sup>, and Neil V. Marrion<sup>§3,4</sup>

From the <sup>§</sup>Department of Physiology and Pharmacology, School of Medical Sciences, University of Bristol, Bristol BS8 1TD, United Kingdom and the <sup>†</sup>Laboratory of Pharmacology and Groupe Interdisciplinaire de Génoprotéomique Appliquée Neurosciences and <sup>1</sup>Laboratory of Medicinal Chemistry and Centre Interfacultaire de Recherche du Médicament, University of Liège, 4000 Liège, Belgium

Activation of small conductance calcium-activated potassium ( $K_{Ca}2$ ) channels can regulate neuronal firing and synaptic plasticity. They are characterized by their high sensitivity to the bee venom toxin apamin, but the mechanism of block is not understood. For example, apamin binds to both  $K_{Ca}2.2$  and  $K_{Ca}2.3$  with the same high affinity ( $K_D \sim 5$  pM for both subtypes) but requires significantly higher concentrations to block functional current ( $IC_{50}$  values of  $\sim 100$  pM and  $\sim 5$  nM, respectively). This suggests that steps beyond binding are needed for channel block to occur. We have combined patch clamp and binding experiments on cell lines with molecular modeling and mutagenesis to gain more insight into the mechanism of action of the toxin. An outer pore histidine residue common to both subtypes was found to be critical for both binding and block by the toxin but not for block by tetraethylammonium (TEA) ions. These data indicated that apamin blocks  $K_{Ca}2$  channels by binding to a site distinct from that used by TEA, supported by a finding that the onset of block by apamin was not affected by the presence of TEA. Structural modeling of ligand-channel interaction indicated that TEA binds deep within the channel pore, which contrasted with apamin being modeled to interact with the channel outer pore by utilizing the outer pore histidine residue. This multidisciplinary approach suggested that apamin does not behave as a classical pore blocker but blocks using an allosteric mechanism that is consistent with observed differences between binding affinity and potency of block.

$K_{Ca}2$  channels (formerly known as SK channels) are characterized by their sensitivity to the highly specific toxin apamin (1). This 18-amino acid peptide, which has been isolated from the honeybee (*Apis mellifera*) venom (2), contains two disulfide bridges that provide a fairly rigid tertiary conformation (3), with two arginine residues (Arg-13 and Arg-14) being critical for its biological activity (4). The cloning of  $K_{Ca}2$  channel subunits has revealed the existence of three subtypes ( $K_{Ca}2.1$ – $K_{Ca}2.3$ , formerly SK1–SK3) (5) that bind apamin with very high affinity

( $K_D \sim 5$ – $10$  pM) (see Ref. 6 for a review). However, apamin is less potent at blocking  $K_{Ca}2$  current and displays differential block of channel subtypes. For example,  $K_{Ca}2.2$  (all species) displays the highest sensitivity, with  $IC_{50}$  values from 27 to 140 pM. Rat, human, and mouse  $K_{Ca}2.3$ -mediated currents show an intermediate sensitivity, with  $IC_{50}$  values ranging from 0.63 to 19 nM. Finally, human  $K_{Ca}2.1$  is the least sensitive, with reported  $IC_{50}$  values ranging between 0.7 and 100 nM (6). These differences between binding and electrophysiological results suggest that the mechanism of block by apamin is complex and that binding and block by the toxin are not identical phenomena.

$K_{Ca}2$  channel subtypes are expressed throughout the CNS and periphery, displaying partially overlapping but distinct locations. This has led to the proposal that block of  $K_{Ca}2$  channels may be a novel target for cognitive enhancement, depression, and dopamine-related disorders (7). However, blockers would be required to display significant selectivity for particular  $K_{Ca}2$  channel subtypes. Differential block of  $K_{Ca}2$  subunits by apamin, and even more so by the peptidic blocker Lei-Dab7 (8), has raised considerable interest. It is clear that understanding the mechanism of this differential block might contribute toward the synthesis of non-peptidic compounds that could selectively target a particular  $K_{Ca}2$  subunit (7). In this study, we have used a multidisciplinary approach, including binding, mutagenesis, structural modeling, and patch clamp experiments with  $K_{Ca}2.2$  and  $K_{Ca}2.3$  channels, to gain a comprehensive understanding of how apamin works. Taken together, our results demonstrate that apamin operates with a mechanism that is not consistent with classical pore block.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Cell Culture and Cell and Membrane Preparation**—Wild-type rat  $K_{Ca}2.2$  (GenBank<sup>TM</sup> accession number NM\_019314) and human  $K_{Ca}2.3$  (GenBank accession number AF031815) channel DNAs were subcloned into the mammalian plasmid expression vectors pcDNA3 (Invitrogen, Paisley, UK) and pFLAGCMV2 (Sigma, Poole, UK), respectively. Point mutations in  $K_{Ca}2.2$  ( $K_{Ca}2.2$ (H337N),  $K_{Ca}2.2$ (N337R),  $K_{Ca}2.2$ (N345G), and  $K_{Ca}2.2$ (N368H)) and  $K_{Ca}2.3$  ( $K_{Ca}2.3$ (H522N) and  $K_{Ca}2.3$ (H491N)) were introduced using the QuikChange XL site-directed mutagenesis kit (Stratagene-Agilent, Stockport, UK) and subsequently confirmed by dye termination DNA sequencing.

Channels were transiently expressed in HEK293 cells. For each passage, cells were dissociated using an EDTA solution and maintained in modified essential medium (DMEM)

\* This work was supported by a grant from the Belgian Science Policy Interuniversity Attraction Poles program and by a "FIRST-Doctorant Entreprise International" grant (Grant 516131) from the Walloon region of Belgium (to C. L.).

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

<sup>2</sup> Research Director of the Fonds de la Recherche Scientifique-FNRS (Belgium).

<sup>3</sup> Both authors contributed equally to this work.

<sup>4</sup> To whom correspondence should be addressed. Fax: 44-1173312288; E-mail: N.V.Marrion@bris.ac.uk

## Allosteric Block of $K_{Ca}2$ Channels by Apamin

(Invitrogen), supplemented with 10% fetal calf serum (Invitrogen) and 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen) at 37 °C. They were plated onto 35-mm dishes (Falcon) 48 h before transfection. For electrophysiology, transient transfections of HEK293 cells were made using polyethyleneimine (Alfa Aesar, Inc.) by combining channel plasmid DNA with enhanced green fluorescent protein DNA in ratio of 1:1 to 1:10 (maximal plasmid content: 1  $\mu$ g). Cells expressing enhanced green fluorescent protein were used for electrophysiology 12–24 h after transfection.

Membranes were prepared for binding experiments as follows. HEK293 cells were plated on a 100-mm dish for 2 days and then transfected with the corresponding plasmid using the polyethyleneimine method without enhanced green fluorescent protein. Cells were harvested after 48 h with cold PBS (4 °C) using 5 ml/dish and centrifuged twice for 10 min at  $1000 \times g$  (4 °C). The pellet was resuspended in a lysis buffer (50 mM Tris, BSA 1%, pH 7.4), mixed thoroughly, and centrifuged for 10 min at  $200 \times g$  (4 °C). The supernatant was centrifuged twice for 20 min at  $16,000 \times g$  (4 °C), and the pellet was resuspended in another buffer (5 mM Tris, 5.4 mM KCl, pH 8.5), using 1 ml/dish. Protein concentration was determined using a colorimetric protein assay with a bicinchoninic acid kit (Pierce). The absorbance was measured at 562 nm with a Multiskan Ascent (Thermo LabSystem, Waltham, MA) spectrophotometer. Glycerol (10%) was then added, and aliquots were stored at  $-80$  °C.

**Electrophysiology**—Expressed  $K_{Ca}2$  currents recorded in either the whole-cell or the excised outside-out patch configurations were evoked in symmetrical high ( $\sim 170$  mM)  $K^+$  conditions using an internal solution that contained 1  $\mu$ M free  $Ca^{2+}$ . Pipettes were fabricated from KG-33 glass (Friedrich & Dimmock, Inc.) or from code 1403513 glass (Hilgenberg, Malsfeld, Germany) and filled with an internal solution composed of KCl (120 mM), HEPES (10 mM), EGTA (10 mM),  $Na_2ATP$  (1.5 mM),  $CaCl_2$  (9.65 mM, calculated free  $[Ca^{2+}]_i$  1  $\mu$ M),  $MgCl_2$  (2.34 mM, calculated free  $[Mg^{2+}]_i$  1 mM), pH 7.4, with  $\sim 40$  mM KOH. Cells were bathed in a control external solution that consisted of KCl (120 mM), HEPES (10 mM), EGTA (10 mM),  $CaCl_2$  (6.19 mM, calculated free  $[Ca^{2+}]_o$  60 nM),  $MgCl_2$  (1.44 mM, calculated free  $[Mg^{2+}]_o$  1 mM), pH 7.4, with  $\sim 40$  mM KOH. Some experiments were carried out using a physiological  $K^+$  external solution composed of NaCl (140 mM), KCl (5 mM), HEPES (10 mM),  $CaCl_2$  (2.5 mM),  $MgCl_2$  (1.2 mM), D-glucose (10 mM), pH 7.4 with NaOH. For kinetic experiments, solutions were rapidly exchanged using an RSC200 rapid switcher (Biologic, Claix, France) or a BPS-8 system from ALA Science (ALA Scientific Instruments, Farmingdale, NY).

Apamin, D-tubocurarine (D-TC),<sup>5</sup> and UCL1684 were purchased from Tocris Biosciences (Bristol, UK). Apamin and D-TC solutions were prepared on the day of experiments from a frozen stock of 100  $\mu$ M and 1 mM in water, respectively. UCL 1684 (Tocris Biosciences) stock was prepared by dissolving in dimethyl sulfoxide (DMSO) to 100  $\mu$ M and stored in aliquots at  $-20$  °C. Tetraethylammonium (TEA) (from Sigma) solutions were prepared from a 1 M stock solution in water. The reversible

$K_{Ca}$  blocker *N*-methyl-laundanosine (NML) (9) was synthesized in-house.

**Binding Experiments**—Saturation binding was carried out in a 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) buffer solution containing 5.4 mM KCl and 0.1% BSA.  $^{125}I$ -apamin was obtained from PerkinElmer Life Sciences (Zaventem, Belgium), with a specific activity of 81.4 TBq/mmol. Glass fiber filters (Whatman GF/C, Maidstone, Kent, UK) used in these experiments were coated for 1 h in 0.5% polyethyleneimine (to prevent apamin from binding to the filter) and then washed with 2.5 ml of the ice-cold buffer just before use. Membrane preparations (final protein concentration: 10  $\mu$ g/ml) were incubated with increasing concentrations of  $^{125}I$ -apamin for 1 h at 0 °C. Binding experiments were terminated as follows: aliquots were filtered under reduced pressure through Whatman filters. Filters were rapidly washed twice with 2.5 ml of ice-cold buffer and placed into a vial containing Ecoscint A (7.5 ml) (National Diagnostics U.S.A., Atlanta, GA). The radioactivity remaining on the filters was measured using a Packard Tri-Carb 1600TR liquid scintillation analyzer with an efficacy of 69%. Nonspecific binding was determined in parallel experiments in the presence of an excess of unlabeled apamin (0.1  $\mu$ M) and subtracted from the total binding to obtain the specific binding. Where  $^{125}I$ -apamin binding was not detected with some mutant channels, positive controls were carried out in tandem on wild-type channels. All binding data were obtained from a minimum of two batches of membranes.

**Molecular Modeling**—A homology model of  $K_{Ca}2.2$  was created as described previously (10). Docking was performed using the software suite Sybyl (Tripos, St. Louis, MO). Docking simulations were produced by energy-minimizing the ligand using the MMF94s force field in Sybyl (Tripos) and then docking the ligand into the  $K_{Ca}2.2$  tetramer model using the Surfex or FlexX docking modules in Sybyl. Interactions were accepted from the lowest energy binding mode. The NMR solved solution structure of apamin was donated by Dr. D. Wemmer (University of California, Berkeley).

**Data Analysis**—For saturation binding experiments, data were fit with a Hill equation of the form

$$\text{Bound/Total bound} = \frac{[\text{apamin}]^{n_h}}{([\text{apamin}] + K_D)^{n_h}} \quad (\text{Eq. 1})$$

with  $K_D$  being the dissociation constant of the peptide and  $n_h$  the Hill coefficient. Curve fitting was carried out using GraphPad Prism 5.02 (GraphPad Software, San Diego, CA). For all experiments, a 1/Y (where Y = Bound/total bound) weighting procedure was used, which gave more weight to the smaller values of radioactivity (*i.e.* those that are close to the  $K_D$ ).

For concentration-response relationships in electrophysiological experiments, data points representing current block were fit with a variable slope Hill equation of the form

$$I/I_{\text{cont}} = I_{\text{min}}/I_{\text{cont}} + \frac{1 - I_{\text{min}}/I_{\text{cont}}}{1 + 10^{(\text{Log}(IC_{50} - X) \times n_h)}} \quad (\text{Eq. 2})$$

where  $I_{\text{cont}}$  is the amplitude of current in the absence of drug,  $I$  is the amplitude of current observed at a given concentration of blocker ( $[X]$ , expressed in logarithmic units),  $IC_{50}$  is the con-

<sup>5</sup> The abbreviations used are: D-TC, D-tubocurarine; TEA, tetraethylammonium; NML, *N*-methyl-laundanosine.



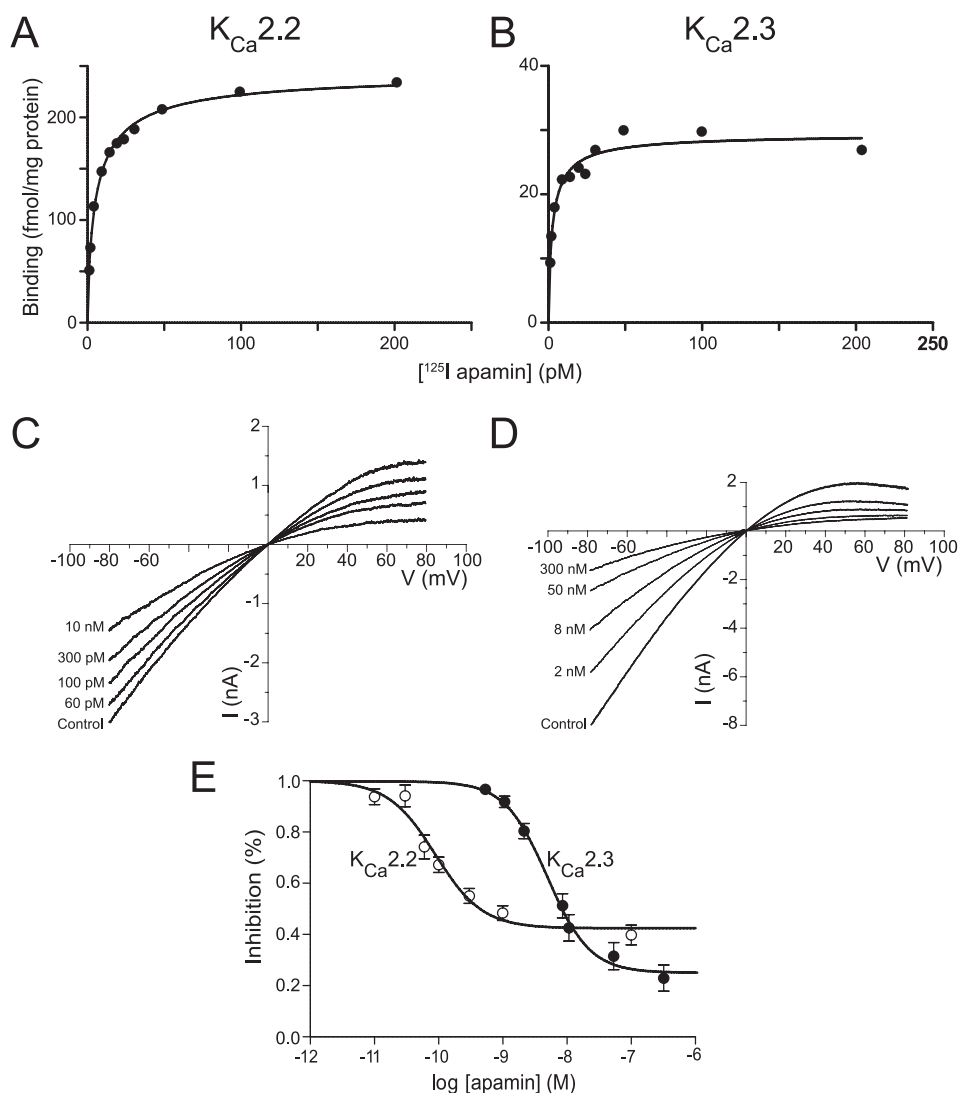


FIGURE 1. **Binding and block of  $K_{Ca2.2}$  and  $K_{Ca2.3}$  channel current by apamin.** *A* and *B*, representative examples of saturation relationships for  $^{125}\text{I}$ -apamin binding to expressed  $K_{Ca2.2}$  (*A*) or  $K_{Ca2.3}$  (*B*) subunits. *C* and *D*, whole-cell macroscopic currents derived from ramps from  $-80$  to  $80$  mV imposed on voltage-clamped HEK293 cells expressing  $K_{Ca2.2}$  (*C*) and (*D*)  $K_{Ca2.3}$  subunits. The application of increasing concentrations of apamin inhibited macroscopic current. *E*, concentration-inhibition relationships for apamin inhibition of expressed  $K_{Ca2.2}$  and  $K_{Ca2.3}$  current.

centration of blocker that blocks 50% of sensitive current, and  $n_h$  is the Hill coefficient (expressed as negative values, but its absolute value is used in the text). Analysis of kinetic electrophysiological experiments is described under "Results."

All numerical values are expressed as mean  $\pm$  S.E. Statistical analysis was performed using Prism 5.02 (GraphPad Software). Data were analyzed with a parametric or non-parametric test where appropriate.

## RESULTS

**High Affinity Binding of Apamin to  $K_{Ca2.2}$  and  $K_{Ca2.3}$  Channels**—The affinity of binding ( $K_D$ ) of apamin to  $K_{Ca2.2}$  and  $K_{Ca2.3}$  channels was assessed in saturation experiments on membranes prepared from transiently transfected HEK293 cells (see "Experimental Procedures"). Binding of  $^{125}\text{I}$ -apamin was saturable, with  $K_D$  values of  $7.5 \pm 2.3$  and  $8.4 \pm 1.7$  pM for  $K_{Ca2.2}$  and  $K_{Ca2.3}$ , respectively ( $n = 7$ ) (Fig. 1, *A* and *B*). These

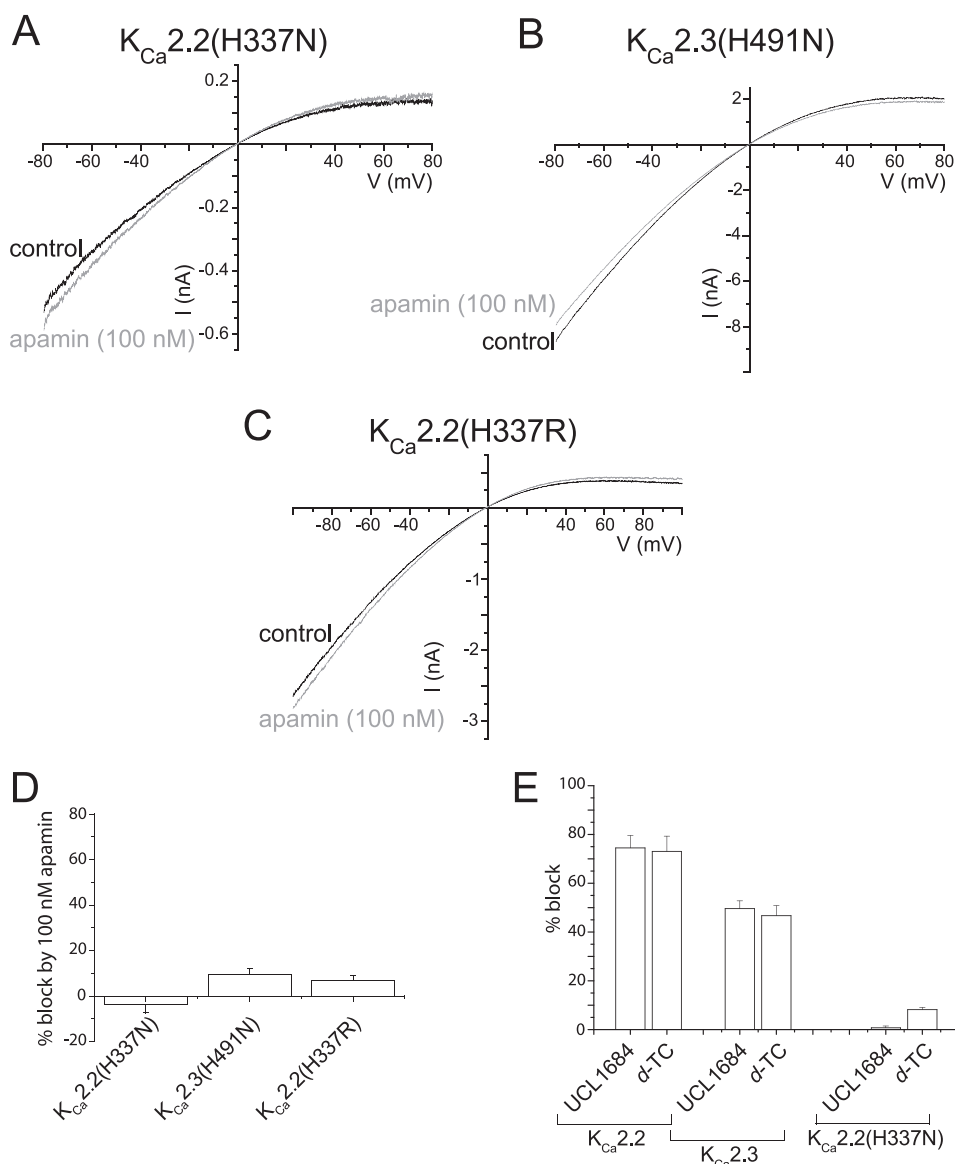
values were not significantly different from each other ( $p = 0.77$ ) and were consistent with previously published values (11). Obtained Hill coefficients were close to unity ( $0.87 \pm 0.03$  and  $0.8 \pm 0.1$ , respectively), indicating that binding was not cooperative.

**Differential Block of  $K_{Ca2.2}$  and  $K_{Ca2.3}$  Currents by Apamin**—Expression of either  $K_{Ca2.2}$  or  $K_{Ca2.3}$  subunits produced inwardly rectifying whole-cell currents in the presence of  $1 \mu\text{M}$  intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  (10, 12–14) (Fig. 1, *C* and *D*). Both  $K_{Ca2.2}$ -mediated and  $K_{Ca2.3}$ -mediated currents were blocked by the addition of apamin, but block was incomplete despite the addition of a supramaximal concentration of the bee venom toxin (15) (Fig. 1, *C–E*). Expressed  $K_{Ca2.2}$  current was more sensitive to block by apamin than  $K_{Ca2.3}$  current. Fig. 1*E* shows the fractional block of  $K_{Ca2.2}$  and  $K_{Ca2.3}$  currents measured at  $-80$  mV in response to increasing concentrations of apamin. The data were fit with the Hill equation, giving the following for  $K_{Ca2.2}$ :  $\text{IC}_{50} = 107 \pm 31$  pM,  $n_h = 1.8 \pm 0.4$  ( $n = 10$ ), and giving the following for  $K_{Ca2.3}$ :  $\text{IC}_{50} = 6.1 \pm 1.6$  nM,  $n_h = 1.4 \pm 0.1$  ( $n = 12$ ) (6). The fitted Hill slope was significantly greater than unity for  $K_{Ca2.3}$  ( $p < 0.02$ ), but not for  $K_{Ca2.2}$  ( $p < 0.08$ ), although a trend was observed. These data suggested that some cooperativity might be utilized to achieve block.

Finally, block of expressed  $K_{Ca2.2}$  and  $K_{Ca2.3}$  current was assessed under physiological  $\text{K}^+$  conditions to determine whether the concentration of external  $\text{K}^+$  affected the potency of block.  $K_{Ca2.2}$  current was blocked by apamin with an  $\text{IC}_{50} = 70 \pm 30$  pM,  $n_h = 0.91 \pm 0.2$  ( $n = 5$ ), whereas  $K_{Ca2.3}$  was blocked with an  $\text{IC}_{50} = 2.6 \pm 0.4$  nM,  $n_h = 1.2 \pm 0.1$  ( $n = 9$ ) under physiological conditions. These values were not significantly different from those obtained in symmetrical  $\text{K}^+$  conditions ( $K_{Ca2.2}$ ,  $p = 0.16$ ;  $K_{Ca2.3}$ ,  $p = 0.25$ ), indicating that the potency of block was not significantly affected by the concentration of external  $\text{K}^+$ .

**A Histidine Residue in the Channel Outer Pore Turret Was Essential for Block by Apamin**—Particular amino acid residues within the outer pore have been reported to influence the sensitivity of  $K_{Ca2}$  channel currents to block by apamin (16). We reported previously that the protonation of an outer pore histidine residue common to both  $K_{Ca2.2}$  and  $K_{Ca2.3}$  channels inhibited macroscopic current using an allosteric mechanism

## Allosteric Block of $K_{Ca}2$ Channels by Apamin



**FIGURE 2. His-337/His-491 residues are critical for block of  $K_{Ca}2.2$  and  $K_{Ca}2.3$  currents by apamin and organic blockers.** A–C, outside-out patch (A and C) and whole-cell (B) macroscopic currents evoked by ramps from  $-80$  to  $80$  mV in the absence (black trace) and the presence of a supramaximal concentration of apamin (100 nM) (gray trace). Mutation of the outer pore His residue in  $K_{Ca}2.2(H337N)$  (A) and  $K_{Ca}2.3(H491N)$  (B) produced currents that were insensitive to the bee venom toxin. Mutation of His-337 in  $K_{Ca}2.2$  to the positively charged arginine ( $H337R$ ) also produced currents that were apamin-insensitive (C). D, graph showing the mean  $\pm$  S.E. inhibition by 100 nM apamin of macroscopic current from each mutant. E, graph showing the lack of block of  $K_{Ca}2.2(H337N)$  by the organic blockers UCL1684 (20 nM) and D-TC (100  $\mu$ M) when compared with block of WT  $K_{Ca}2.2$ - and  $K_{Ca}2.3$ -mediated current.

(10). It was possible that this His residue may interact with apamin to cause block. The sensitivity to block by apamin of the mutant channels  $K_{Ca}2.2(H337N)$  and  $K_{Ca}2.3(H491N)$  was investigated to examine this possibility, in which the common basic His residue had been replaced with an uncharged asparagine. Fig. 2, A and B, show representative  $K_{Ca}2.2(H337N)$  and  $K_{Ca}2.3(H491N)$  currents in symmetrical high  $K^+$  solutions before and after the application of 100 nM apamin. Currents were not significantly blocked by 100 nM apamin (Fig. 2D;  $K_{Ca}2.2(H337N)$   $p = 0.22$ ,  $K_{Ca}2.3(H491N)$   $p = 0.11$ ,  $n = 5$ ). These data suggested that this common His residue located in the S5-PHelix loop was crucial to the inhibitory interaction of apamin with the channel. Radioligand binding experiments showed no specific binding of  $^{125}I$ -apamin (up to 300 pM) to either

$K_{Ca}2.2(H337N)$  or  $K_{Ca}2.3(H491N)$  channels ( $n = 3$  for both mutants, data not shown). These data indicated that the His residue located in the S5-PHelix loop was critically required for the binding and subsequent block of  $K_{Ca}2.2$  and  $K_{Ca}2.3$  channels by apamin.

It is possible that the proton acceptor property of the outer pore His residue, rather than the possibility of the residue possessing a net positive charge, was required for binding of apamin and subsequent channel block. Mutation of the His-337 residue to the positive arginine to yield  $K_{Ca}2.2(H337R)$  produced a channel current that was also resistant to inhibition by 100 nM apamin (Fig. 2, C and D;  $p = 0.43$ ). These data indicated that binding and block by apamin required the electrostatic features of the un-ionized basic His residue in the channel outer pore.

*The His Residue in the Outer Pore Turret Also Contributed to Block of  $K_{Ca}2.2$  by D-Tubocurarine and UCL1684*—The structural features of apamin proposed to confer high affinity binding have been used to design organic molecule blockers of  $K_{Ca}2$  channels, providing a pharmacophore for  $K_{Ca}2$  channel blockers (17, 18). A number of small organic molecule blockers of  $K_{Ca}2$  channels, including dequalinium, D-TC, and several cyclic bis-quinolinium cyclophanes derived from dequalinium (e.g. UCL1684), possess two positively charged quinolinium groups that are spatially separated to be analogous to the separation of the positive guanidinium groups of the two arginine residues in apamin. These organic molecules displace

$^{125}I$ -apamin binding and are proposed to interact with the apamin binding site (19, 20). This would suggest that like block by apamin, block by these organic compounds would also require the outer pore His residue. This was tested by determining the sensitivity of  $K_{Ca}2.2(H337N)$ -mediated current to block by supramaximal concentrations of UCL1684 (21) (20 nM) and D-TC (100  $\mu$ M) (Fig. 2E). The mutant channel was insensitive to both blockers (Fig. 2E; UCL1684  $p = 0.47$   $n = 3$ , D-TC  $p = 0.12$   $n = 4$ ). These data were consistent with binding displacement studies and indicated that the outer pore His residue in the S5-PHelix loop that is common to all  $K_{Ca}2$  channel subtypes was essential to the binding and block by apamin and organic blockers.



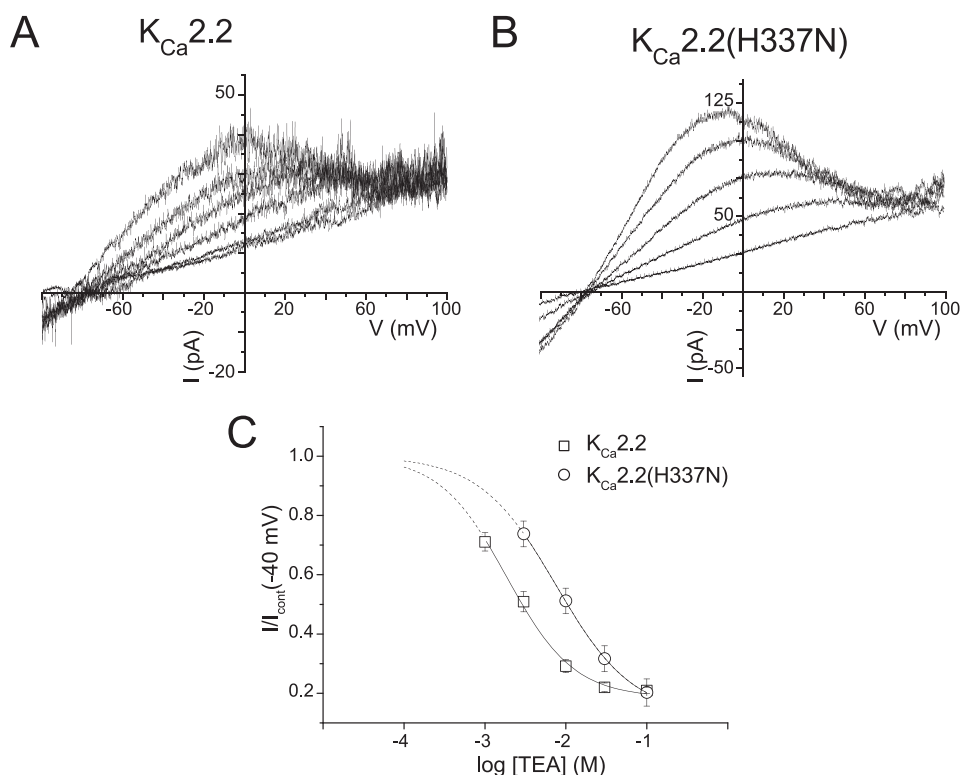


FIGURE 3. **Block of  $K_{Ca}2.2$  and  $K_{Ca}2.2(H337N)$  channels by extracellular TEA.** *A* and *B*, representative traces from outside-out patches of expressed  $K_{Ca}2.2$  (*A*) and  $K_{Ca}2.2(H337N)$  (*B*) channel currents evoked by voltage ramps from  $-100$  to  $100$  mV in the absence and presence of increasing concentrations of extracellular TEA. Experiments were performed in low ( $5$  mM) extracellular  $[K^+]$ , with increasing concentrations of TEA being substituted for NaCl. *C*, concentration-inhibition relationships for block of wild-type  $K_{Ca}2.2$  and mutant  $K_{Ca}2.2(H337N)$  current by TEA (see “Results” for details).

*The  $K_{Ca}2.2(H337N)$  Mutant Retained Sensitivity to TEA*—It is possible that the lack of block by apamin, UCL1684, and D-TC of  $K_{Ca}2.2(H337N)$  and  $K_{Ca}2.3(H491N)$  channel currents resulted from the mutation affecting pore structure. We used TEA ions to probe for any inner pore structural changes that might have been caused by these mutations. TEA acts as a classic pore blocker, interacting at the extracellular mouth of the selectivity filter in  $K^+$  channels to obstruct  $K^+$  flux (22–25). TEA can therefore be used as a “molecular caliper” to probe the dimensions of the inner pore under different conditions. Different sensitivities are proposed to indicate differences in pore structure and dynamics (26, 27). Fig. 3, *A* and *B*, show current traces from outside-out patches recorded in low external  $K^+$  (to allow the iso-osmotic addition of TEA to the bath solution), showing that both WT and mutant  $K_{Ca}2.2$  channel currents were blocked by TEA. A plot of the fractional current ( $I/I_{cont}$ ) measured at  $-40$  mV against the concentration of TEA was fit with the Hill equation and revealed a sensitivity to block for  $K_{Ca}2.2$  of  $IC_{50} = 1.9 \pm 0.24$  mM with a Hill slope  $n_h = 1.1 \pm 0.1$  and for  $K_{Ca}2.2(H337N)$ ,  $IC_{50} = 7.7 \pm 0.6$  mM,  $n_h = 0.9 \pm 0.1$  (Fig. 3C). These data showed that  $K_{Ca}2.2(H337N)$  was significantly less sensitive to TEA than WT  $K_{Ca}2.2$  ( $p < 0.001$ ,  $n = 3$ ). The Hill slopes for both channels were not significantly different from unity ( $p > 0.05$ ,  $n = 3$ ), consistent with a one-to-one binding interaction that would be expected for a pore-blocking mechanism (28). The block of  $K_{Ca}2.2(H337N)$ -mediated current by TEA indicated that the general architecture of the inner pore was maintained by this mutation. However, it is likely that

the  $\sim 4$ -fold reduction in sensitivity to TEA suggests that the mutation of the outer pore His residue caused a slight change in the structure of the inner pore mouth where TEA is predicted to bind (see below).

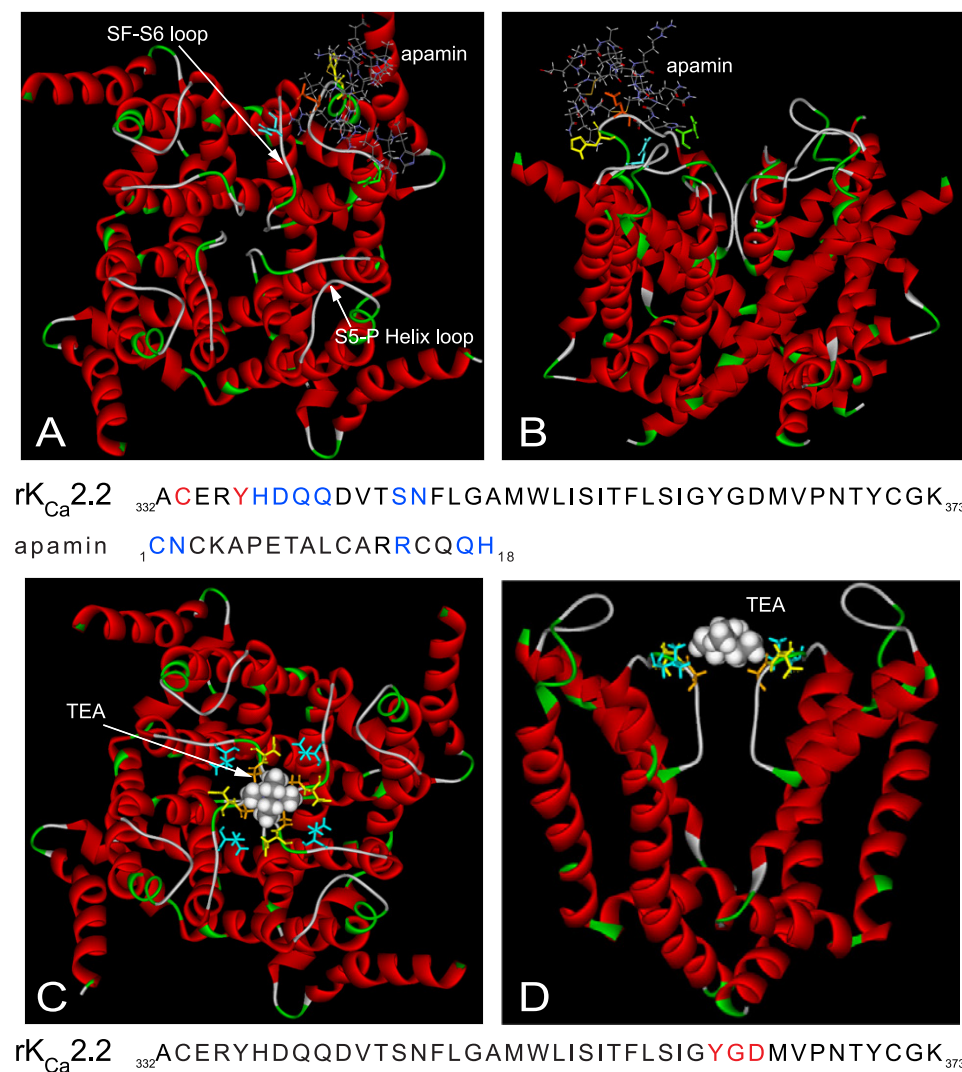
*Molecular Modeling of Apamin and TEA Interactions with the  $K_{Ca}2.2$  Pore Region Suggested Distinct Binding Sites*—Despite significant differences in functional properties,  $K_{Ca}2$  channels are likely to share pore architecture with Kv channels (29). The mutation of an outer pore valine (Val-342) residue in  $K_{Ca}2.2$  to the glycine that confers sensitivity of Kv channels to charybdotoxin created a charybdotoxin-sensitive  $K_{Ca}2.2$  channel (29). The similarities in the effect of these mutations on  $K_{Ca}2.2$  and Kv channels indicated that both the inner pore architecture and the outer pore architecture are similar in these two channel classes. We used our previously published homology model (10), based on the crystal structure of Kv1.2 (Protein Data Bank code 2a79B), to model the interactions of apamin

and TEA with the  $K_{Ca}2.2$  channel (see “Experimental Procedures” for details).

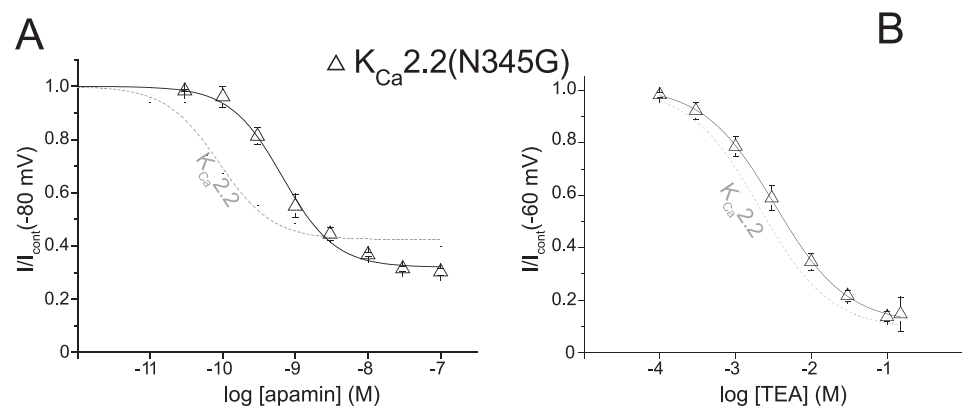
Fig. 4, *A* and *B*, show the results of a docking simulation of apamin targeted to the S5-PHelix loop region of the  $K_{Ca}2.2$  pore region homology model that contains the important His-337 residue. Fig. 4*A* shows a top down view of the channel displayed in ribbon form and the apamin molecule in stick form. The loop regions of the outer pore are indicated by arrows. Apamin was found to interact with a number of the residues in the S5-PHelix loop, specifically forming H-bonds between the toxin residue Asn-2 and channel residue His-337, Arg-14 of apamin, and channel residues Gln-339 and Gln-340, the C1 thiol group of apamin and Asp-338 in the channel outer pore, Gln-17 residue of the toxin and Asn-345 of the channel and His-18 of the toxin, and Ser-344 of  $K_{Ca}2.2$  (highlighted blue in the pore region sequence displayed). Other residues with electrostatic interactions are highlighted in red. Fig. 4*B* shows a transverse view of the interaction. The most striking feature of the docking simulation was the large distance between apamin and the conduction pathway for  $K^+$  ions.

Targeting residues that have been shown to affect TEA sensitivity through mutational studies in  $K_{Ca}2$  (23) and Kv channels (30) allowed the interaction between the quaternary ammonium ion and  $K_{Ca}2.2$  to be modeled (Fig. 4, *C* and *D*). Fig. 4*C* shows a top down view of the channel displayed in ribbon form and the TEA molecule in space-filled mode for display, with TEA modeled to interact directly above the selectivity filter (Fig. 4, *C* and *D*). TEA was modeled to interact within the

## Allosteric Block of $K_{Ca}2$ Channels by Apamin



**FIGURE 4. Structural modeling of the interaction between the  $K_{Ca}2.2$  channel and apamin or TEA.** *A* and *B*, top down (*A*) and side (*B*) views of apamin docked to the outer pore region of  $K_{Ca}2.2$ . Channel residues discussed under "Results" are highlighted as follows: His-337 (yellow), Gln-339 (orange), Asn-345 (green), and Asn-368 (cyan). Residues within the channel outer pore and apamin that make contact by hydrogen bonds are colored blue, whereas those channel residues making electrostatic interactions are in red. *C* and *D*, top down (*C*) and side (*D*) views of the interaction between TEA and  $K_{Ca}2.2$ . The quaternary ammonium ion is modeled to interact within the inner pore of the channel by electrostatic interactions with the C=O group of Tyr-362 (distance between C=O and  $N^+$   $\sim 4$  Å), and the ethyl groups of TEA interact via van der Waals contacts with Gly-363 (orange), Asp-364 (yellow), and Val-366 (cyan).

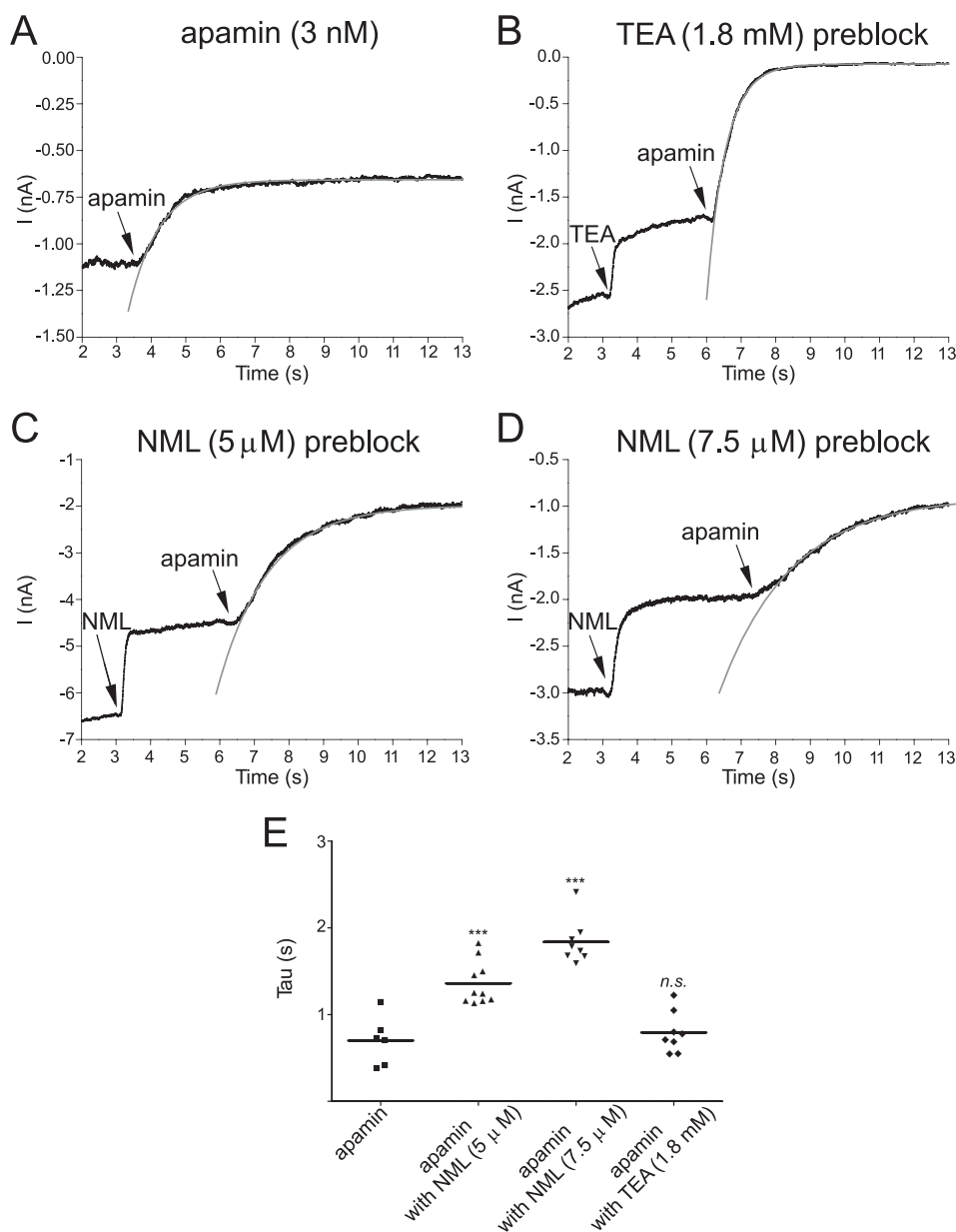


**FIGURE 5. Reduced sensitivity to block by apamin displayed by  $K_{Ca}2.2(N345G)$ .** *A*, concentration-inhibition relationship for block of expressed  $K_{Ca}2.2(N345G)$  channel current by apamin. The dashed gray curve shows the sensitivity of block of wild-type  $K_{Ca}2.2$  current for comparison. *B*, concentration-inhibition relationship for block of  $K_{Ca}2.2(N345G)$  current by extracellular TEA. The relationship of block by TEA of wild-type  $K_{Ca}2.2$  current is shown for comparison (dashed gray line), showing that the channel mutation had little effect upon block by the quaternary ion.

channel pore by electrostatic interactions with the C=O group of Tyr-362, whereas the ethyl groups of TEA interact via van der Waals contacts with Gly-363 and Asp-364 within the selectivity sequence and Val-366 (highlighted red in the sequence displayed below the docking). These data suggested that apamin does not traverse the pore to cause block by occluding the passage of  $K^+$  ions through the selectivity filter, whereas TEA is likely to act as a pore blocker.

*K<sub>Ca</sub>2.2(N345G) Displayed a Reduced Sensitivity to Apamin but Retained High Binding Affinity*—A mutational approach was used to determine whether the modeled interaction of  $K_{Ca}2.2$  and apamin was accurate. The Gln-17 residue of apamin was modeled to interact with Asn-345 by formation of a hydrogen bond. This channel pore residue was mutated to the small uncharged glycine residue to neutralize the polar nature of the wild-type asparagine residue. Fig. 5*A* displays the concentration-response relationship for block of the  $K_{Ca}2.2(N345G)$  mutant by apamin. The data were fit with the Hill equation and gave values of  $IC_{50} = 4.5 \pm 0.8$  nM,  $n_h = 1.30 \pm 0.06$  ( $n = 10$ ), showing that mutation of Asn-345 significantly reduced sensitivity to apamin in comparison with WT  $K_{Ca}2.2$  (mean  $IC_{50}$ : 107 pM) ( $p < 0.001$ , Student's *t* test for unpaired values). The value of the Hill coefficient was significantly larger than 1 ( $p < 0.001$ , Student's *t* test). In contrast, TEA sensitivity was not significantly altered by this mutation ( $K_{Ca}2.2$   $IC_{50} = 2.2 \pm 0.3$  mM,  $n_h = 0.97 \pm 0.05$  ( $n = 3$ ),  $K_{Ca}2.2(N345G)$   $IC_{50} = 3.8 \pm 1$  mM,  $n_h = 0.99 \pm 0.09$  ( $n = 4$ ,  $p = 0.84$  for  $IC_{50}$  and  $p = 0.24$  for Hill slope) (Fig. 5*B*), indicating that the inner pore region was unaltered.

Binding affinity of apamin for the  $K_{Ca}2.2(N345G)$  mutant ( $K_D$   $8.9 \pm 4.1$  pM,  $n = 4$ ) was not significantly different from binding to WT  $K_{Ca}2.2$  channels ( $p = 0.75$ , Student's *t* test for unpaired values, data not shown). The Hill coefficient



**FIGURE 6. Apamin and TEA block  $K_{Ca}2.3$  current by using non-interacting binding sites.** *A*, example trace of whole-cell holding current recorded at  $-80$  mV from a cell expressing  $K_{Ca}2.3$  channels and bathed in high extracellular  $K^+$  solution. Fast application of apamin (3 nM) produced a block with a  $\tau_{on}$  of  $0.70 \pm 0.12$  s. Fits are shown as gray lines in all panels. *B*, membrane current recorded at  $-50$  mV from a cell expressing  $K_{Ca}2.3$  channel subunits. Fast application of TEA (1.8 mM) blocked  $\sim 30\%$  of current but had no effect on the time course of subsequent block by fast applied apamin (3 nM) ( $\tau_{on}$  of  $0.79 \pm 0.08$  s). *C*, fast application of NML (5  $\mu$ M) blocked  $\sim 40\%$  of expressed  $K_{Ca}2.3$  current, with the presence of this channel blocker slowing the rate of block by the subsequent fast application of apamin ( $\tau_{on}$  slowed to  $1.36 \pm 0.08$  s). *D*, a greater slowing of the rate of block by apamin was produced by a higher concentration of NML, with  $\tau_{on}$  of block by apamin (3 nM) being slowed to  $1.84 \pm 0.09$  s in 7.5  $\mu$ M NML. *E*, graph showing individual values from all experiments of the  $\tau_{on}$  (Tau) of block by apamin (3 nM) applied in the absence or presence of either TEA (1.8 mM) or NML (5 and 7.5  $\mu$ M). A one-way analysis of variance showed that  $\tau_{on}$  values were significantly different from each other ( $F = 37, p < 0.001$ ). Tukey's post-hoc tests showed that the  $\tau_{on}$  of apamin was unaffected by TEA ( $p > 0.05$ ), but was significantly affected by both concentrations of NML ( $p < 0.05$ ). *n. s.*, not significant. \*\*\*, significant with  $p < 0.001$ .

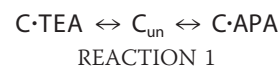
cient was  $1.01 \pm 0.13$ . These data supported the modeled interaction of apamin and  $K_{Ca}2.2$  channel and suggested that the interaction of apamin with Asn-345 was involved in the translation between binding and channel block.

**Apamin and TEA Blocked  $K_{Ca}2$  Channels Using Non-interacting Binding Sites**—The evidence presented so far suggested that apamin may not act as a classic pore blocker as is proposed

for TEA. As both interact in the pore region, it was pertinent to further address the question of whether the binding sites for TEA and apamin overlap. Current remaining in the presence of a partially inhibiting concentration of TEA represented a measure of the probability that the channels were not occupied by a TEA molecule ( $p(C_{un})$ , with possible values between 0 and 1) (31).

$$i/i_{cont} = p(C_{un}) = \frac{1}{1 + \frac{[TEA]}{K_{D,app}}} \quad (\text{Eq. 3})$$

If TEA and apamin were to compete with each other for occupancy of the same binding site such that one could not bind if the other were already bound, the binding kinetics would be described by the following scheme.



In this reaction,  $C_{un}$  represents the unblocked channel,  $C \cdot TEA$  represents the channel bound with TEA, and  $C \cdot APA$  represents the channel bound with apamin. It is clear that the on-rate for apamin block in the presence of TEA would be dependent on the probability ( $p(C_{un})$ ) of the channel being unoccupied by TEA. The equation for the relaxation time course to equilibrium for a bimolecular reaction following a rapid increase in the concentration of apamin would therefore be modified from

$$\tau_{on} = \frac{1}{k_{-1} + k_{+1}[APA]} \quad (\text{Eq. 4})$$

in the absence of TEA to

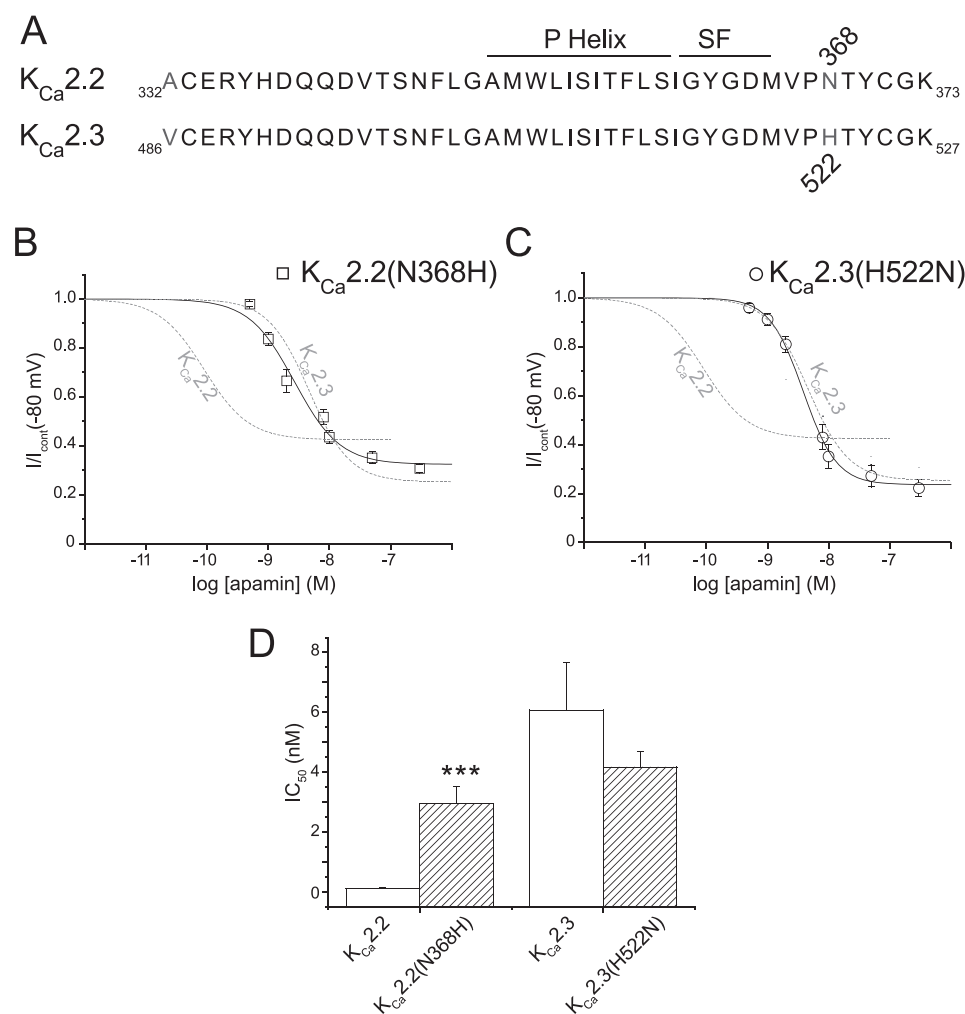
$$\tau_{on} = \frac{1}{k_{-1} + k_{+1}[APA]p(C_{un})} \quad (\text{Eq. 5})$$

in the presence of a constant concentration of TEA. Therefore, the on-rate for apamin should be slower in the presence of TEA if the blocking sites of apamin and TEA overlapped.

The time course of block by apamin was well fit with a single exponential function. The rate of block by apamin was unchanged when applied after current was partly blocked by the application of TEA (Fig. 6A, B, and E). The current



## Allosteric Block of $K_{Ca2}$ Channels by Apamin



**FIGURE 7. Pore-mimicking mutants reveal differences between  $K_{Ca2.2}$  and  $K_{Ca2.3}$  structure.** *A*, sequence alignment of the pore regions of  $K_{Ca2.2}$  and  $K_{Ca2.3}$  channels, with residues that differ highlighted in gray. *SF*, channel selectivity filter. *B*, concentration-inhibition relationships of  $K_{Ca2.2}(\text{N368H})$ , a mutation that produced a  $K_{Ca2.2}$  channel whose pore mimicked  $K_{Ca2.3}$ . This mutation produced a channel current that was blocked by apamin with a sensitivity that was similar to that seen with wild-type  $K_{Ca2.3}$  current. The relationships of block by apamin of wild-type  $K_{Ca2.2}$  and  $K_{Ca2.3}$  currents are shown for comparison in dashed gray. *C*, mutation of the outer pore of  $K_{Ca2.3}$  to mimic  $K_{Ca2.2}$  ( $K_{Ca2.3}(\text{H522N})$ ) produced a current that was blocked by apamin with a sensitivity that was not significantly different from wild-type  $K_{Ca2.3}$  current. The relationships of block by apamin of wild-type  $K_{Ca2.2}$  and  $K_{Ca2.3}$  currents are shown for comparison in dashed gray. *D*, bar chart displaying the  $IC_{50}$  values showing the reduction in sensitivity in  $K_{Ca2.2}(\text{N368H})$  when compared with WT  $K_{Ca2.2}$  ( $p < 0.0001$ ,  $n = 7-10$ ). No significant shift was observed for  $K_{Ca2.3}(\text{H522N})$  when compared with WT  $K_{Ca2.3}$  ( $p > 0.05$ ,  $n = 8-12$ ).

decays from separate experiments were fit with single exponentials that yielded time constants ( $\tau_{on}$ ) for block by 3 nM apamin of  $0.70 \pm 0.12$  ( $n = 6$ ) and  $0.79 \pm 0.08$  s ( $n = 8$ ) for apamin in the presence of a concentration of TEA that was close to the observed  $IC_{50}$  (1.8 mM). In contrast, the rate of block by apamin of current partly blocked by NML was slowed to  $1.36 \pm 0.08$  s in the presence of 5  $\mu\text{M}$  NML and  $1.84 \pm 0.09$  s in 7.5  $\mu\text{M}$  NML ( $n = 10$  and 8, respectively) (Fig. 6, *C*, *D*, and *E*). The effect of NML was consistent with the  $K_{Ca2}$  channel blocker (9) competing with apamin binding (32), whereas the lack of effect of TEA suggested that TEA and apamin block  $K_{Ca2}$  channels by acting at non-interacting and likely separate sites.

**Effect of the  $K_{Ca2.2}$  Asn-368 Position on the Sensitivity of the Channels to Apamin**—It was originally reported that Asn-368 within the outer pore region of  $K_{Ca2.2}$  was an important con-

tributor to providing a higher sensitivity to block by apamin than observed with h $K_{Ca2.1}$  (16). However, the role of this residue is less clear with the subsequent finding that h $K_{Ca2.1}$  current was not resistant to block by apamin (15). This residue is the only difference between the sequences in the SF-S6 loop region for  $K_{Ca2.2}$  (Asn-368) and  $K_{Ca2.3}$  (His-522) (Fig. 7A), and it is unknown whether this distinction underlies the different sensitivities ( $IC_{50}$ ) to apamin block of  $K_{Ca2.2}$  ( $\sim 100$  pM) and  $K_{Ca2.3}$  ( $\sim 5$  nM). Mutation of Asn-368 in  $K_{Ca2.2}$  to mimic the pore sequence of  $K_{Ca2.3}$  ( $K_{Ca2.2}(\text{N368H})$ ) produced a channel that bound  $^{125}\text{I}$ -apamin with a  $K_D$  of  $7.1 \pm 0.59$  pM ( $n = 8$ ), which was not significantly different from binding to WT  $K_{Ca2.2}$  ( $p = 0.85$ ) or  $K_{Ca2.3}$  ( $p = 0.47$ ). In contrast,  $K_{Ca2.2}(\text{N368H})$  current was blocked by apamin with a sensitivity that was not significantly different from block of WT  $K_{Ca2.3}$  ( $IC_{50} = 2.96 \pm 0.6$  nM,  $n_h = 1.47 \pm 0.21$ ,  $n = 7$ ,  $p = 0.09$ ). This value was significantly greater than that observed for WT  $K_{Ca2.2}$  (Fig. 7, *B* and *D*;  $p < 0.001$ ). These data suggested that Asn-368 was critical for the extra functional sensitivity to block by apamin of  $K_{Ca2.2}$  when compared with  $K_{Ca2.3}$ . These findings suggested that  $K_{Ca2.3}$  mutated to mimic the pore of  $K_{Ca2.2}$  ( $K_{Ca2.3}(\text{H522N})$ ) would display a sensitivity to block by apamin like WT  $K_{Ca2.2}$ . Perhaps surprisingly, the sensitivity of  $K_{Ca2.3}(\text{H522N})$

remained unchanged when compared with the WT channel ( $p = 0.35$ , Fig. 7, *C* and *D*). The data were fit with the Hill equation and gave  $IC_{50}$  values of  $4.2 \pm 0.5$  nM,  $n_h = 1.67 \pm 0.12$  ( $n = 8$ ,  $n_h$  significantly different from 1,  $p = 0.0008$ , Student's *t* test) (see "Discussion").

**$K_{Ca2.2}$  Channels Can Be Blocked by Only One Apamin Molecule**—Co-expression of  $K_{Ca2.2}$  and  $K_{Ca2.1}$  (16) or  $K_{Ca2.2}$  and  $K_{Ca2.3}$  subunits (23) produced functional heteromeric channels that displayed sensitivities to blockers that were intermediate to those observed for homomeric channels. We used the same approach using heteromeric channels containing the apamin-sensitive WT  $K_{Ca2.2}$  subunits and apamin-insensitive  $K_{Ca2.2}(\text{H337N})$  subunits to determine how subunit stoichiometry might affect apamin sensitivity. Expressed currents were sensitive to apamin (Fig. 8A). The mean data were best fit by the sum of two Hill equations (Fig.



## Allosteric Block of $K_{Ca2}$ Channels by Apamin

### DISCUSSION

Point mutations within the outer pore region of  $K_{Ca2}$  channels have been shown to affect the sensitivity of block by apamin (16, 29), which has led to the assumption that the bee venom toxin acts as a pore blocker. However, it has been recently reported that a point mutation in the S3-S4 extracellular loop had a major impact on the sensitivity of h $K_{Ca2.1}$  current to block by apamin (33). This information places doubt on whether apamin can act as a pore blocker, as it is unlikely that apamin is large enough to bind to an extracellular loop and traverse deep into the pore to cause block.

This study has identified two pore residues that influence apamin sensitivity (His-337/His-491 of  $K_{Ca2.2}$  and  $K_{Ca2.3}$ , respectively, and Asn-345 of  $K_{Ca2.2}$ ) to add to the formerly identified residues (16). Macroscopic currents from the mutants  $K_{Ca2.2}$ (H337N) and the equivalent  $K_{Ca2.3}$ (H491N) were both insensitive to 100 nM apamin, revealing the importance of the His residue located in the S5-PHelix loop of the outer pore in the apamin interaction. This lack of block arose from a loss of apamin binding. The  $K_{Ca2.2}$ (H337R) mutant was also insensitive, indicating that it was the proton acceptor property of the His residue that was crucial to both binding and block. We had previously found that external protons allosterically inhibited  $K_{Ca2}$  current by interacting with the outer pore His residue (10), and it is possible that positively charged residues on apamin might mimic protons and interact with the His residue. Structural modeling of the interaction of apamin with  $K_{Ca2.2}$  channel produced a lowest energy interaction that positioned apamin away from the selectivity filter, interacting with multiple residues in the S5-PHelix loop, including both the outer pore His and some already proposed to mediate the apamin-channel interaction (16). This modeled interaction was supported by the lower sensitivity to block by apamin of the  $K_{Ca2.2}$ (N345G) mutant. A previous study showing that a serine residue in the S3-S4 loop region contributed to high affinity block of  $K_{Ca2.2}$  by apamin suggested that the outer pore region residues alone do not compose the complete binding site but do so in combination with the S3-S4 loop (33). Based on the orientation of the S3-S4 transmembrane segments within the Kv1.2 structure, it is possible that the S3-S4 loop may come into close contact with the S5-PHelix loop region. Our modeled interaction of apamin with  $K_{Ca2.2}$  placed Arg-13 of the toxin projecting away from the pore region of the channel, making it possible that this residue could interact with residues outside the channel pore. Therefore, our modeled interaction is consistent with mutational studies and suggests that apamin is unlikely to physically occlude the pore.

The  $K_{Ca2.2}$ (H337N) channel was also found to be insensitive to supramaximal concentrations of  $K_{Ca2.2}$  and  $K_{Ca2.3}$  channel organic molecule blockers such as D-TC, UCL1684, and NML (data not shown for the latter). These molecules all displace  $^{125}$ I-apamin binding and must compete for either part of or the entire binding site used by the toxin (17–19, 32). Therefore, the lack of block by these compounds was not surprising based on the overlap of the binding sites. However, the implications of these data were surprising. It is likely that apamin does not block  $K_{Ca2}$ -mediated current by occluding the pore. Therefore, it is unlikely that D-TC, UCL1684, and NML are pore blockers. However, it is possible that the  $K_{Ca2.2}$ (H337N) mutation might perturb pore shape that

would prevent binding of these organic blockers. We used TEA to investigate whether this might have been the case.

TEA has been used as a molecular caliper to probe the inner pore of Kv channels (27). TEA could be used in the same way for  $K_{Ca2}$  channels, but first, it had to be determined whether apamin and TEA bound to non-overlapping sites. TEA was modeled to interact close to the selectivity filter of a  $K_{Ca2}$  channel, in a region that has been previously proposed based on mutation studies (23). These data suggested that apamin and TEA bound to distinct sites within the pore region of these channels. This was supported by the finding that the presence of TEA did not affect the kinetics of apamin block. In contrast, the kinetics of block was slowed in a concentration-dependent manner by NML, a blocker known to compete for the same binding site as the toxin. These data provided strong evidence that apamin and TEA do not bind to overlapping binding sites. For comparison, an opposite conclusion was drawn concerning TEA and charybdotoxin block of single BK channels (31). It is clear that TEA can also be used with  $K_{Ca2}$  channels to probe the channel inner pore. The apamin-insensitive mutant  $K_{Ca2.2}$ (H337N) was less sensitive to block by TEA ( $IC_{50}$  ~8 mM) than the WT channel ( $IC_{50}$  ~2 mM). The reduced sensitivity of  $K_{Ca2.2}$ (H337N) suggested that the inner pore region was somewhat altered by this mutation, but much less so than the extent to which the apamin site was perturbed. The absolute effect of this mutation on apamin binding indicated that this residue was a significant contributor to the binding site of the toxin. The lack of block of  $K_{Ca2.2}$ (H337N) by D-TC, UCL1684, and NML would suggest that these blockers also bind to the outer pore, a suggestion supported by the fact that these blockers displace apamin binding. Therefore, these compounds are not pore blockers and, like apamin, must inhibit macroscopic  $K_{Ca2}$  current by an allosteric mechanism. This suggestion would help to explain the disparity between binding  $K_D$  values (~8  $\mu$ M for both  $K_{Ca2.2}$  and  $K_{Ca2.3}$ ) and the functional inhibition of current by apamin, particularly in  $K_{Ca2.3}$  ( $IC_{50}$  ~5 nM). This proposed separation of binding and block was supported by the finding that no cooperativity of apamin binding was observed, whereas positive cooperativity was observed for functional inhibition.

Two residues within the pore sequence of  $K_{Ca2}$  channels have been identified that might be involved in translating binding to block. The first was Asn-345 within  $K_{Ca2.2}$ , where mutation to glycine produced a channel that displayed a lowered sensitivity to block by apamin but retained high affinity binding for the toxin. The second was Asn-368 within  $K_{Ca2.2}$ , which corresponds to His-522 in  $K_{Ca2.3}$ . The sensitivity to block by apamin was reduced to that of  $K_{Ca2.3}$  by mutation of Asn-368 to His, but high affinity binding for apamin was retained. These data were in accord with previous work, where mutation of the corresponding His in h $K_{Ca2.1}$  to Asn to mimic the pore sequence of  $K_{Ca2.2}$  increased sensitivity to block by apamin (16). The Asn-368 within  $K_{Ca2.2}$  is modeled to directly interact with Gln-340 and not apamin, with Gln-340 being modeled to interact with the toxin. Therefore, mutation of Asn-368 would be expected to affect block but not binding of apamin. In contrast, Asn-345 within  $K_{Ca2.2}$  is modeled to directly interact with apamin by hydrogen bonding. Mutation of Asn-345 to glycine affected block but not binding of the toxin. It is clear that at least His-337 in the outer pore turret is essential for binding of apamin, whereas Ser-243 in the extracellular S3-S4 loop



of  $K_{Ca2.2}$  is suggested to contribute to high affinity binding (33). Therefore, it is likely that the lack of effect of mutation of Asn-345 on binding of apamin reflects that interaction of the toxin with this residue is crucial in translating binding to block, rather than it significantly contributing to high affinity binding. No residues modeled to interact with apamin will bind  $K^+$  ions because changes in external  $K^+$  concentration had no effect on the block of either  $K_{Ca2.2}$  or  $K_{Ca2.3}$  by apamin. Finally, care must be taken when considering apamin binding and block of  $K_{Ca2.3}$  current. For example, mutation of  $K_{Ca2.3}$  to mimic the  $K_{Ca2.2}$  pore ( $K_{Ca2.3}(H522N)$ ) did not have any effect on apamin sensitivity. These data support the suggestion either that the pore shape of  $K_{Ca2.2}$  and  $K_{Ca2.3}$  differs (10) or that differences might exist in the mechanism of transduction of binding to block between  $K_{Ca2.2}$  and  $K_{Ca2.3}$ .

The presented modeling and mutagenesis data suggested that apamin binds to the channel outer pore rather than deep within the inner pore. Therefore, it is possible that multiple apamin molecules bind to the channel simultaneously to cause block. Concentration-response relationships for apamin block of  $K_{Ca2.3}$  currents produced Hill slopes that were significantly greater than 1 (with a trend toward this also observed for  $K_{Ca2.2}$ ). This suggested that more than one molecule of apamin binds to cause block and that positive cooperativity exists to produce block. The proposal that two or more molecules of apamin bind to produce high sensitivity block was supported by the finding that channel heteromers consisting of the apamin-sensitive WT  $K_{Ca2.2}$  and apamin-insensitive  $K_{Ca2.2}(H337N)$  subunits displayed two distinct populations of sensitive current. The higher sensitivity site ( $IC_{50,a} \sim 270$  pM) displayed a Hill slope of  $>1$  and is proposed to correlate with those channels that contained adjacent WT  $K_{Ca2.2}$  subunits. In contrast, the lower sensitivity component ( $IC_{50,b} \sim 33$  nM) displayed a Hill slope of 0.85 and is proposed to comprise current from channels that contained two non-adjacent WT  $K_{Ca2.2}$  subunits or only one WT  $K_{Ca2.2}$  subunit. In contrast, Hill slopes of unity were produced for apamin binding, indicating no positive cooperativity (11, 34, 35). Clearly, this difference might indicate that although no cooperativity exists between the binding of two or more apamin molecules, adjacent subunits bound with apamin do interact to cause block. In summary, we suggest that apamin does not block  $K_{Ca2}$  channels with a simple pore-blocking mechanism. It is proposed that apamin binding to the outer pore causes a disruption of the structural coupling between the outer pore region and the selectivity filter, causing collapse of the selectivity filter to impair conduction of  $K^+$  ions. This allosteric hypothesis provides a novel mechanistic basis for block of  $K_{Ca2}$  current by apamin, thus aiding the search for subtype-specific non-peptidic inhibitors of the  $K_{Ca2}$  channel subfamily.

*Acknowledgment*—We thank Christelle Gillissen for technical assistance.

## REFERENCES

- Blatz, A. L., and Magleby, K. L. (1986) *Nature* **323**, 718–720
- Vincent, J. P., Schweitz, H., and Lazdunski, M. (1975) *Biochemistry* **14**, 2521–2525
- Pease, J. H., and Wemmer, D. E. (1988) *Biochemistry* **27**, 8491–8498
- Labbé-Jullié, C., Granier, C., Albericio, F., Defendini, M. L., Ceard, B., Rochat, H., and Van Rietschoten, J. (1991) *Eur. J. Biochem.* **196**, 639–645
- Köhler, M., Hirschberg, B., Bond, C. T., Kinzie, J. M., Marrion, N. V., Maylie, J., and Adelman, J. P. (1996) *Science* **273**, 1709–1714
- Pedarzani, P., and Stocker, M. (2008) *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 3196–3217
- Liégeois, J. F., Mercier, F., Graulich, A., Graulich-Lorge, F., Scuvée-Moreau, J., and Seutin, V. (2003) *Curr. Med. Chem.* **10**, 625–647
- Shakkottai, V. G., Regaya, I., Wulff, H., Fajloun, Z., Tomita, H., Fathallah, M., Cahalan, M. D., Gargus, J. J., Sabatier, J. M., and Chandy, K. G. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 43145–43151
- Scuvee-Moreau, J., Liegeois, J. F., Massotte, L., and Seutin, V. (2002) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **302**, 1176–1183
- Goodchild, S. J., Lamy, C., Seutin, V., and Marrion, N. V. (2009) *J. Gen. Physiol.* **134**, 295–308
- Finlayson, K., McLuckie, J., Hern, J., Aramori, I., Olverman, H. J., and Kelly, J. S. (2001) *Neuropharmacology* **41**, 341–350
- Soh, H., and Park, C. S. (2001) *Biophys. J.* **80**, 2207–2215
- Stocker, M. (2004) *Nat. Rev. Neurosci.* **5**, 758–770
- Li, W., and Aldrich, R. W. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 1075–1080
- Dale, T. J., Cryan, J. E., Chen, M. X., and Trezise, D. J. (2002) *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **366**, 470–477
- Ishii, T. M., Maylie, J., and Adelman, J. P. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 23195–23200
- Dilly, S., Graulich, A., Farce, A., Seutin, V., Liegeois, J. F., and Chavatte, P. (2005) *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **20**, 517–523
- Sørensen, U. S., Strøbaek, D., Christophersen, P., Hougaard, C., Jensen, M. L., Nielsen, E. Ø., Peters, D., and Teuber, L. (2008) *J. Med. Chem.* **51**, 7625–7634
- Cook, N. S., and Haylett, D. G. (1985) *J. Physiol.* **358**, 373–394
- Castle, N. A., Haylett, D. G., Morgan, J. M., and Jenkinson, D. H. (1993) *Eur. J. Pharmacol.* **236**, 201–207
- Rosa, J. C., Galanakis, D., Ganellin, C. R., Dunn, P. M., and Jenkinson, D. H. (1998) *J. Med. Chem.* **41**, 2–5
- Heginbotham, L., and MacKinnon, R. (1992) *Neuron* **8**, 483–491
- Monaghan, A. S., Benton, D. C., Bahia, P. K., Hosseini, R., Shah, Y. A., Haylett, D. G., and Moss, G. W. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 1003–1009
- Lenaus, M. J., Vamvouka, M., Focia, P. J., and Gross, A. (2005) *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 454–459
- Ahern, C. A., Eastwood, A. L., Lester, H. A., Dougherty, D. A., and Horn, R. (2006) *J. Gen. Physiol.* **128**, 649–657
- Molina, A., Castellano, A. G., and López-Barneo, J. (1997) *J. Physiol.* **499**, 361–367
- Bretschneider, F., Wrisch, A., Lehmann-Horn, F., and Grissmer, S. (1999) *Biophys. J.* **76**, 2351–2360
- Hille, B. (2001) *Ion Channels of Excitable Membranes*, pp. 539–574, Sinauer Associates, Sunderland, MA
- Jäger, H., and Grissmer, S. (2004) *Toxicol.* **43**, 951–960
- Heginbotham, L., Abramson, T., and MacKinnon, R. (1992) *Science* **258**, 1152–1155
- Miller, C. (1988) *Neuron* **1**, 1003–1006
- Graulich, A., Mercier, F., Scuvée-Moreau, J., Seutin, V., and Liégeois, J. F. (2005) *Bioorg. Med. Chem.* **13**, 1201–1209
- Nolting, A., Ferraro, T., D'hoedt, D., and Stocker, M. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 3478–3486
- Hugues, M., Duval, D., Kitabgi, P., Lazdunski, M., and Vincent, J. P. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 2762–2769
- Grunnet, M., Jensen, B. S., Olesen, S. P., and Klaerke, D. A. (2001) *Pflugers Arch.* **441**, 544–550



## Molecular and Cellular Pharmacology

The sigma agonist 1,3-di-*o*-tolyl-guanidine directly blocks SK channels in dopaminergic neurons and in cell linesCédric Lamy<sup>a,1</sup>, Jacqueline Scuvée-Moreau<sup>a,1</sup>, Sébastien Dilly<sup>b</sup>, Jean-François Liégeois<sup>b</sup>, Vincent Seutin<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Laboratory of Pharmacology, GIGA-Neurosciences, University of Liège, B-4000 Sart-Tilman/Liège 1, Belgium<sup>b</sup> Laboratory of Medicinal Chemistry, Drug Research Center, University of Liège, B-4000 Sart-Tilman/Liège 1, Belgium

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 11 September 2009

Received in revised form 27 April 2010

Accepted 6 May 2010

Available online 26 May 2010

## Keywords:

SK channel

Sigma receptor

DTG

Dopaminergic neuron

## ABSTRACT

Small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> (SK) channels are widely expressed in the brain and underlie medium-duration afterhyperpolarizations (mAHPs) in many types of neurons. It was recently reported that the activation of sigma-1 (σ<sub>1</sub>) receptors inhibits SK currents in rat hippocampus. Because many interactions between σ receptors and brain dopaminergic systems have been reported, we set out to examine putative effects of σ receptor ligands on the SK mediated mAHP in midbrain dopaminergic neurons. We found that 1,3-di-*o*-tolyl-guanidine (DTG) inhibited the mAHP in a concentration-dependent manner (~60% inhibition at 100 μM), while other σ receptor agonists (carbetapentane, (+)-SKF10047 and PRE-084) had little effect. Moreover, the effect of DTG was not affected by high concentrations of the σ<sub>1</sub> receptor antagonist BD 1047. A role for σ<sub>2</sub> receptors could also be excluded by the lack of effect of the σ<sub>2</sub> receptor ligand 5-bromo-tetrahydroisoquinolylbenzamide. These results argue against a coupling of σ receptors to SK channels in dopaminergic neurons. We next hypothesized that DTG could directly block the channel. This hypothesis was tested in HEK-293 cells which were transiently transfected with rSK2 or hSK3 subunits. DTG inhibited the current flowing through both subtypes with mean IC<sub>50</sub>s ~200 μM. This action was also unaffected by BD 1047. Other σ receptor ligands had little or no effect. We conclude that DTG directly blocks SK channels. This pharmacological action may be important to consider in future experimental settings.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

SK channels are apamin-sensitive, small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels underlying the medium-duration afterhyperpolarization (mAHP) which is observed in many types of central neurons (Sah, 1996). Three subunits have been cloned: SK1 (K<sub>Ca</sub>2.1), SK2 (K<sub>Ca</sub>2.2) and SK3 (K<sub>Ca</sub>2.3) (Kohler et al., 1996). They show differential brain localization: SK1 and SK2 subtypes are mainly expressed in the hippocampus and cortex, while SK3 expression is higher in subcortical areas, especially in monoamine cell regions (Stocker and Pedarzani, 2000; Wolfart et al., 2001).

Previous studies have shown the importance of SK channels in the modulation of the firing pattern of midbrain dopaminergic neurons. These neurons display a prominent apamin-sensitive mAHP. Blockade of this mAHP results in increased irregularity of firing *in vitro* (Shepard and Bunney, 1991; Wolfart et al., 2001; Scuvée-Moreau et al., 2002) and increased phasic activity *in vivo* (Waroux et al., 2005). In line with these observations, different studies suggest that SK

channels could represent new interesting targets for the development of novel therapeutic agents (Liégeois et al., 2003; Blank et al., 2004).

Several mechanisms are involved in Ca<sup>2+</sup> mobilization and SK channel activation (Xia et al., 1998; Seutin et al., 2000; Pedarzani et al., 2001; Wolfart and Roeper, 2002; Goldberg and Wilson, 2005; Hallworth et al., 2003; Womack et al., 2004), including modulation by several neurotransmitters and second-messenger pathways (Sah, 1996; Faber, 2009). Interestingly, a new mechanism involving sigma (σ) receptors has been proposed. Recent experiments (Martina et al., 2007) suggest that the opening of SK channels in rat hippocampus is prevented by activation of σ<sub>1</sub> receptors.

σ receptors are widely distributed in the central nervous system; two subtypes have been identified (σ<sub>1</sub> and σ<sub>2</sub>). Each subtype has different pharmacological profiles, anatomical distribution and physiological functions. σ receptors appear to be involved in multiple modulatory actions, including on neurotransmitter release, receptor function, lipid transport, ion channel activity and Ca<sup>2+</sup> homeostasis (Walker et al., 1990; Debonnel, 1993; Hanner et al., 1996; Vilner and Bowen 2000; Aydar et al., 2002; Su and Hayashi, 2003; Monnet, 2005; Hayashi and Su, 2005; Hayashi and Su, 2007; Katnik et al., 2006).

Various studies suggest that σ receptors could modulate the function of dopaminergic neurons: 1) autoradiographic studies in the rat brain have shown a high density of both σ<sub>1</sub> and σ<sub>2</sub> receptors in the substantia nigra pars compacta (Bouchard and Quirion, 1997); 2)

\* Corresponding author. GIGA-Neurosciences, University of Liège (B36), B-4000 Sart-Tilman/Liège 1, Belgium. Tel.: +32 43662525; fax: +32 43662523.

E-mail address: [V.Seutin@ulg.ac.be](mailto:V.Seutin@ulg.ac.be) (V. Seutin).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to the work.



electrophysiological studies suggest that some  $\sigma$  receptor ligands may modulate, albeit in different ways, the pattern of discharge of midbrain dopaminergic neurons (Ceci et al., 1988; Engberg and Wikstrom, 1991; Zhang et al., 1992; Minabe et al., 1999); 3) the intrastriatal administration of  $\sigma$  receptor ligands modulates basal dopamine release *in vivo* (Moison et al., 2003); 4)  $\sigma$  receptor ligands modulate NMDA-stimulated dopamine release in rat striatal slices (Gonzalez and Werling, 1997); 5)  $\sigma$  receptor ligands induce motor effects which involve the nigro-striatal system (Bastianetto et al., 1995).

This work was therefore initiated in order to better understand the putative mechanisms involved in the interaction between  $\sigma$  receptor ligands and dopaminergic neurons. In a first series of experiments, we studied the influence of  $\sigma$  receptor ligands on the apamin-sensitive mAHP of these neurons in rat brain slices. These experiments showed that, among several  $\sigma$  receptor ligands, only 1,3-di-*o*-tolyl-guanidine (DTG) inhibited the mAHP and that this effect did not involve  $\sigma$  receptors. This was further investigated using patch-clamp recordings in transfected HEK293 cells. These experiments confirmed that DTG directly blocks SK channels.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Brain slice experiments

Recordings were performed in rat brain slices. The methods used were similar to those described previously (Seutin et al., 1997). Male Wistar rats (150–200 g) were housed and handled in accordance with guidelines of the National Institute of Health (NIH Publications No. 85-23, 1985). Rats were anaesthetized with chloral hydrate (400 mg/kg *i. p.*) and decapitated. The brain was excised quickly and placed in cold ( $\sim 4^\circ\text{C}$ ) artificial cerebro-spinal fluid (aCSF) of the following composition (in mM): NaCl 130, KCl 3.5,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1.25,  $\text{MgSO}_4$  1.25,  $\text{CaCl}_2$  2, glucose 10,  $\text{NaHCO}_3$  24, saturated with 95%  $\text{O}_2$  and 5%  $\text{CO}_2$  (pH 7.4). A block of tissue containing the midbrain was sliced in 350  $\mu\text{m}$  horizontal sections on a Vibratome 1000 Plus (Vibratome, Saint-Louis, MO, USA). The slice containing the substantia nigra was placed on a nylon mesh in a recording chamber and held in position with an electron microscopy grid weighed down by short pieces of platinum wire. The slice was completely immersed in continuously heated aCSF ( $34.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ , flow rate  $\pm 2$  ml/min).

Intracellular recordings were made using glass microelectrodes filled with KCl 2M (resistance 70 to 150 M $\Omega$ ). All recordings were made in the bridge balance mode, using a BA-1S amplifier (NPI, Tamm, Germany). The accuracy of the bridge was checked throughout the experiment by examining the voltage deflection induced by a small ( $-50$  pA) current injection. The potential of the extracellular medium was measured at the end of each experiment and its absolute value was within 5 mV of that set to zero at the start. Membrane potentials and injected currents were recorded on a Gould TA240 chart recorder and on a Fluke Combiscope oscilloscope. The Flukeview software was used for off-line analysis. Most recordings were made from neurons located in the substantia nigra pars compacta. Identification of dopaminergic cells was performed on the basis of electrophysiological and pharmacological criteria as described previously (Seutin et al., 1997; Scuvée-Moreau et al., 2004). Drug effects on the prominent apamin-sensitive mAHP in dopaminergic neurons were quantified as the percent reduction of the surface area of the AHP (in mV s) which was blocked by a maximally active concentration of apamin (300 nM) (Seutin et al., 1997). Averages of four sweeps were considered in all cases. In these experiments, the spontaneous firing of the neurons was reduced by constant current injection ( $-20$  to  $-100$  pA) in order to increase the amplitude of the mAHP. Because the amplitude of the AHP is very sensitive to the firing rate, care was taken to compare all mAHPs of one cell at the same firing rate; this necessitated only very small adjustments of the amplitude of injected currents (*i.e.* less than 20 pA). All drugs were applied by bath superfusion and their effect was quantified after their concentration had

equilibrated in the tissue (usually 5 min). Concentration–response curves for AHP inhibition were fitted with the Hill equation using GraphPad Prism version 5.02 for Windows, (GraphPad Software, San Diego California USA) and  $\text{IC}_{50}$ s and Hill coefficients were determined.

### 2.2. Patch-clamp studies

Experiments were performed on transiently transfected HEK–293 cells. The cells were transfected with 1.5  $\mu\text{g}$  cDNA coding for the SK2 or SK3 subunit and with 1  $\mu\text{g}$  EGFP cDNA using polyethyleneimine (Alfa-Aesar, Karlsruhe, Germany) (Boussif et al., 1995). The cDNAs (15  $\mu\text{l}$  of 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) were mixed with 50  $\mu\text{l}$  of a 0.2- $\mu\text{g}$  polyethyleneimine/ $\mu\text{l}$  solution; this solution was added to 125  $\mu\text{l}$  DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Invitrogen, Merelbeke, Belgium). Cells were kept under standard culture conditions (DMEM with 10% calf serum supplemented with streptomycin/penicillin). The transfection mixture was added to a serum-free Petri dish having a cell confluency of  $\sim 60\%$ . Cells were used between 21 and 25 h after transfection. Whole-cell patch-clamp experiments were performed at room temperature ( $21\text{--}23^\circ\text{C}$ ) in the voltage clamp mode using an EPC-10 (Heka, Lambrecht, Germany) controlled by Patchmaster (Heka, Lambrecht, Germany). Borosilicate pipettes were pulled with a P87 puller (Sutter Instruments, Novato, CA, USA) and fire-polished using a microforge (Narishige, London, UK) to achieve a tip resistance between 2 and 4 M $\Omega$ . Recordings during which the series resistance (as given by the amplifier) was above 8 M $\Omega$  were discarded. Cells were slowly superfused ( $\sim 2$  ml/min) with a solution which contained no drug, except in the experiments involving the  $\sigma$  receptor antagonist BD 1047, in which case pre-incubation for several minutes with the compound ensured a complete saturation of any corresponding receptors before applying DTG. An 8-channel-perfusion system (VM8, Ala science, Westbury, NY, USA) was used for all other drug applications. In high external  $\text{K}^+$  experiments, the composition of the external solution was (in mM): KCl 127, Na HEPES 10, EGTA 10,  $\text{CaCl}_2$  6.19,  $\text{MgCl}_2$  1.44; the pH was adjusted to 7.4 with KOH. The physiological  $\text{K}^+$  solution contained (in mM): NaCl 110, KCl 5, Na HEPES 10, EGTA 10,  $\text{CaCl}_2$  6.19,  $\text{MgCl}_2$  1.44; the pH was adjusted to 7.4 using NaOH. In all experiments, the internal solution contained (in mM): KCl 127, Na HEPES 10, BAPTA 10,  $\text{Na}_2\text{ATP}$  1.5,  $\text{CaCl}_2$  8.98,  $\text{MgCl}_2$  2.34. This gave a concentration of 1  $\mu\text{M}$  free  $\text{Ca}^{2+}$ . The pH was adjusted to 7.4 using KOH. The osmolarity of the solutions ranged from 295 to 305 mOsm. The holding potential was set at the reversal potential for  $\text{K}^+$  ( $-84$  mV in physiological  $\text{K}^+$  experiments and 0 mV in high external  $\text{K}^+$  experiments). In high external  $\text{K}^+$  experiments, the membrane potential was brought to  $-80$  mV for 500 ms. This was followed by 1 s ramps from  $-80$  to  $+80$  mV. In physiological  $\text{K}^+$  experiments, the holding potential was brought to  $-130$  mV and ramps were made from this potential to  $+50$  mV. Drug effects were measured at  $-80$  mV in high external  $\text{K}^+$  and at  $-130$  mV in physiological  $\text{K}^+$ . Concentration–response curves for current block were fitted with the Hill equation using GraphPad Prism version 5.02 for Windows, (GraphPad Software, San Diego California USA) and  $\text{IC}_{50}$ s and Hill coefficients were determined.

### 2.3. Compounds

Compounds used in this study and their sources were as follows: apamin, DTG (1,3-di-*o*-tolyl-guanidine) (obtained from Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA), carbetapentane citrate, (+)-SKF10047 ([2S-(2a,6a,11R\*)]-1,2,3,4,5,6-hexahydro-6,11-dimethyl-3-(2-propenyl)-2,6-methano-3-benzazocin-8-ol hydrochloride), PRE-084 (2-(4-morpholinethyl)-1-phenylcyclohexanecarboxylate hydrochloride), BD1047 (*N*-[2-(3,4-dichlorophenyl)ethyl]-*N*-methyl-2-(dimethylamino)ethylamine dihydrobromide) (obtained from Tocris Cookson Inc, Ballwin, MO), haloperidol (gift from Janssen-Cilag) and sulpiride (gift from Sanofi Aventis). Apamin is the

classical SK blocker (Hugues et al., 1982), DTG is a nonselective  $\sigma$  receptor agonist, carbetapentane, (+)-SKF10047 and PRE-084 are selective  $\sigma_1$  receptor agonists, BD1047 and haloperidol are preferential  $\sigma_1$  receptor antagonists (Rothman et al., 1990; Matsumoto et al., 1995; Maurice et al., 1999). 5-Bromo-tetrahydroisoquinolinylbenzamide, a new selective  $\sigma_2$  receptor ligand, was synthesized in the Laboratory of Medicinal Chemistry using the described method (Mach et al., 2004). Haloperidol and sulpiride were dissolved in DMSO; DTG was first dissolved in water with a drop of lactic acid; all other drugs were dissolved in water. Compounds were further diluted in aCSF or the external patch solution to reach the required concentration.

#### 2.4. Statistical analysis

Numerical values are expressed as means  $\pm$  S.E.M. Statistical analysis was performed using a Student's *t* test, an ANOVA test or a Kruskal–Wallis test as appropriate. The level of significance was set at  $P < 0.05$ .

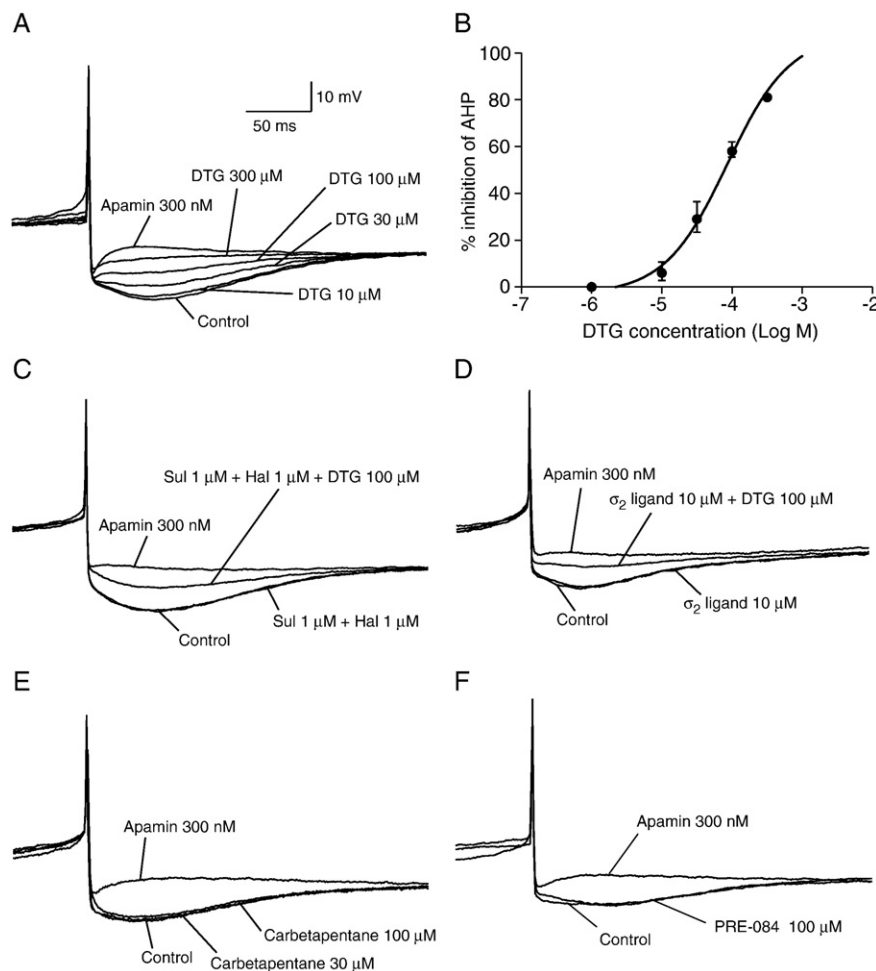
### 3. Results

#### 3.1. Slice experiments

Among the  $\sigma$  receptor ligands that were tested, only DTG induced a concentration-dependent inhibition of the apamin-sensitive mAHP

(Fig. 1A) of midbrain dopaminergic neurons. The mean percentage of inhibition observed at 100  $\mu$ M was  $58.1 \pm 2.5\%$  (mean  $\pm$  S.E.M.,  $n = 8$ ). The effect of this concentration of DTG was reversible: an almost complete recovery was observed after a one hour wash period. At a concentration of 300  $\mu$ M, DTG usually induced aspecific effects resulting in a cessation of cell firing, so the effect of that concentration could only be evaluated in one neuron (81% of inhibition of the mAHP). The  $IC_{50}$  and the Hill coefficient extrapolated from the mean values obtained at the different concentrations tested were 86  $\mu$ M and 0.97, respectively (Fig. 1B). Contrary to DTG, the selective  $\sigma_1$  receptor agonists carbetapentane ( $n = 6$ ) (Fig. 1E), (+)-SKF10047 ( $n = 4$ ) (not shown) or PRE-084 ( $n = 7$ ) (Fig. 1F) induced a weak and inconsistent inhibition of the mAHP when superfused at concentrations ranging from 1  $\mu$ M to 100  $\mu$ M.

In order to investigate the role of  $\sigma_1$  receptors in DTG-induced inhibition of the apamin-sensitive mAHP,  $\sigma_1$  receptor antagonists BD1047 and haloperidol were used. These experiments were performed in the continuous presence of the D2 blocker sulpiride in order to exclude the possibility that any influence of haloperidol could be due to its antagonism of D2 receptors. Neither BD 1047 nor haloperidol blocked the effect of DTG on the apamin-sensitive AHP (Fig. 1C). In the presence of BD 1047 (30–100  $\mu$ M) or haloperidol (1  $\mu$ M + sulpiride 1  $\mu$ M), DTG (100  $\mu$ M) induced an inhibition of  $55.8 \pm 4.9\%$  ( $n = 4$ ) and  $54.7 \pm 3\%$  ( $n = 3$ ) respectively. These values were not significantly different from the one obtained in control



**Fig. 1.** Intracellular recordings of dopaminergic neurons showing that: (A,B) the nonselective  $\sigma$  receptor agonist DTG induces a concentration-dependent reduction of the apamin-sensitive mAHP with an extrapolated  $IC_{50}$  of 86  $\mu$ M. There is no error bar for 300  $\mu$ M because only one experiment could be performed (see text); (C) the effect of DTG 100  $\mu$ M is not blocked by the  $\sigma$  receptor antagonist haloperidol (Hal) in the presence of sulpiride (Sul) to block D2 receptors; (D) the  $\sigma_2$  receptor ligand 5-bromo-tetrahydroisoquinolinylbenzamide 10  $\mu$ M does not modify the mAHP and does not antagonize the effect of DTG 100  $\mu$ M; (E, F) the selective  $\sigma_1$  receptor agonists carbetapentane and PRE-084 fail to significantly modify the apamin-sensitive mAHP when applied up to the high concentration of 100  $\mu$ M.

conditions ( $P > 0.05$ ). The  $\sigma_2$  receptor ligand 5-bromo-tetrahydroisoquinolylbenzamide did not modify the mAHP of dopaminergic neurons when superfused at concentrations ranging from 10 to 100  $\mu\text{M}$  ( $n = 9$ ). Furthermore, it did not antagonize the effect of DTG (Fig. 1D). In the presence of 5-bromo-tetrahydroisoquinolylbenzamide (10  $\mu\text{M}$ ), DTG (100  $\mu\text{M}$ ) induced an inhibition of  $56.8 \pm 3.42\%$  of the mAHP ( $n = 3$ ), a value also not significantly different from the one obtained in the absence of the drug ( $P > 0.05$ ).

In addition to the apamin-sensitive mAHP, the influence of DTG on various other electrophysiological parameters was investigated. In 11 out of 14 cells, DTG 100  $\mu\text{M}$  did not modify action potential amplitude ( $51.4 \pm 2.4$  mV before DTG versus  $50.7 \pm 2.6$  mV after DTG,  $P > 0.05$ ) or action potential duration ( $0.94 \pm 0.04$  ms at mid-height before DTG versus  $0.96 \pm 0.04$  ms after DTG,  $P > 0.05$ ). In 3 out of 14 cells, DTG 100  $\mu\text{M}$  induced a decrease in the amplitude of the action potential ( $56 \pm 4$  mV before DTG versus  $50.3 \pm 1$  mV after DTG) as well as an increase in action potential duration ( $0.91 \pm 0.06$  ms at mid-height before DTG versus  $1.0 \pm 0.0$  ms after DTG). The reversibility of this effect was not tested. A similar effect on action potential amplitude and duration was observed in 2 out of 4 neurons treated with (+)-SKF10047 (reversibility not tested), in 1 out of 7 neurons treated with PRE084 (effect quickly reversible) and in 2 out of 6 neurons treated with carbetapentane (with cessation of cell discharges) when a high concentration (100  $\mu\text{M}$ ) was used.

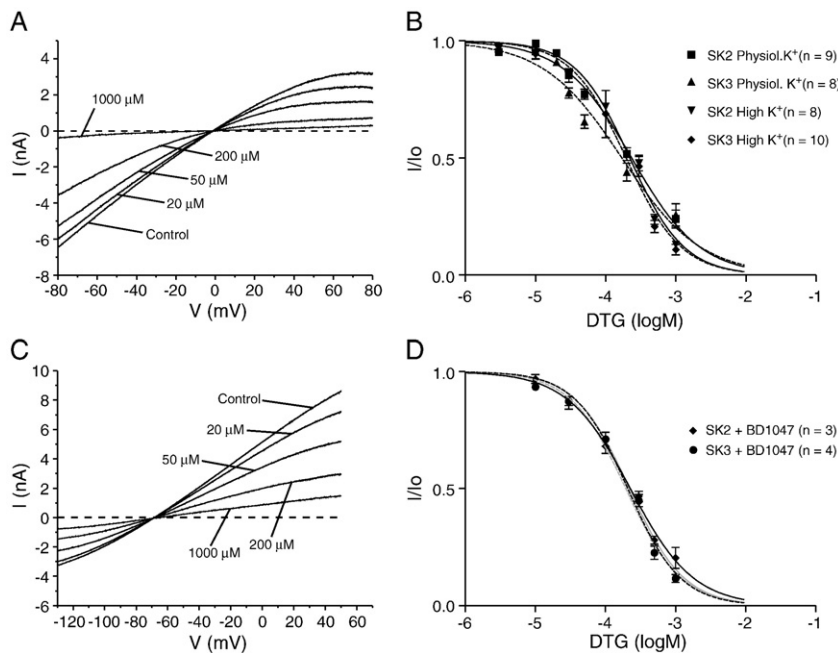
The effect of DTG on the membrane potential, input resistance and  $I_h$  current was examined in three cells in the presence of 1  $\mu\text{M}$  tetrodotoxin (TTX). For this purpose, neurons were hyperpolarized to  $-65$  mV by continuous current injection ( $-120$  to  $-200$  pA); their resistance was evaluated by measuring the voltage deflection induced by a small injection of current ( $-40$  to  $-50$  pA), and a robust  $I_h$  current was elicited by current injections of  $-80$  to  $-150$  pA. In 2 out of 3 cells, DTG 100  $\mu\text{M}$  had no effect on membrane potential, input resistance or the sag in membrane potential induced by activation of  $I_h$  (not shown). An increase in input resistance was however observed in one cell (from 240 to 300 M $\Omega$ ).

### 3.2. Experiments in cell lines

All currents reported here had the hallmarks of SK currents, including dependence on intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  and inhibition by the selective blockers apamin ( $\text{IC}_{50}$ :  $\sim 90$  pM for SK2 and  $\sim 5$  nM for SK3; Lamy et al., unpublished) and *N*-methyl-laudanosine ( $\text{IC}_{50}$ :  $\sim 2$   $\mu\text{M}$  for SK2 and  $\sim 3$   $\mu\text{M}$  for SK3) (Scuvée-Moreau et al., 2004). A variable amount of inward rectification was observed at potentials positive to  $E_K$ , mostly in symmetrical  $\text{K}^+$  (Fig. 2A), as already described in detail by others (Soh and Park, 2002).

A first set of experiments was performed in high external  $\text{K}^+$ . This condition is usually preferred because large inward currents are observed at moderately negative membrane potentials (Bildl et al., 2004; Peitersen et al., 2006). DTG induced a concentration-dependent inhibition of SK2 and SK3 currents with a similar potency. The  $\text{IC}_{50}$ s of DTG on SK2 and SK3 currents were  $225 \pm 17$   $\mu\text{M}$  ( $n = 8$ ) and  $228 \pm 33$   $\mu\text{M}$  ( $n = 10$ ), respectively (Fig. 2B). These values were not different from each other ( $P > 0.05$ , Student's *t* test). Additional experiments were performed in physiological  $\text{K}^+$  (Fig. 2C). DTG exhibited similar potencies on SK2 and SK3 currents, with  $\text{IC}_{50}$ s of  $265 \pm 36$   $\mu\text{M}$  ( $n = 9$ ) and  $217 \pm 49$   $\mu\text{M}$  ( $n = 8$ ), respectively. These values were not different from each other ( $P > 0.05$ , Student's *t* test). An ANOVA test also showed no global difference between any of the previous conditions ( $P = 0.79$ , Fig. 2B). All Hill coefficient values were close to 1 (means: 0.8 and 0.9 in physiological  $\text{K}^+$  for SK2 and SK3, respectively, and 1.1 in high external  $\text{K}^+$  for both subtypes). When examining the current inhibition throughout the voltage range studied, no clear evidence for voltage-dependence emerged (Fig. 2A and C). Note that currents reversed at a slightly more depolarized potential ( $\sim -70$  mV) than the theoretical  $E_K$  in asymmetrical  $\text{K}^+$ . This may have been due to the presence of a small leak current with a depolarized reversal potential. All subsequent experiments were performed in high external  $\text{K}^+$ .

In order to exclude the possibility that DTG acts via an interaction with  $\sigma$  receptors, its effect was tested in the presence of the  $\sigma_1$



**Fig. 2.** Whole-cell patch-clamp recordings showing that DTG directly blocks SK currents in transfected cell lines. (A) SK2 current traces evoked by ramps from  $-80$  to  $+80$  mV in control conditions (high external  $\text{K}^+$ ) and in the presence of various concentrations of DTG. (B) Concentration–response curves for the block by DTG of SK2 and SK3 (dotted line) currents, both in high and physiological external  $\text{K}^+$ . (C) Traces showing the inhibitory effect of increasing concentrations of DTG on SK3 currents in physiological external  $\text{K}^+$ . Current traces were evoked by ramps from  $-130$  to  $+50$  mV. (D) Concentration–response curves of DTG obtained in high external  $\text{K}^+$  on SK2 and SK3 (dotted line) currents in the presence of BD1047 (100  $\mu\text{M}$ ). Experiments without the  $\sigma_1$  receptor antagonist (shown in panel A) are represented in grey for comparison.



receptor antagonist BD 1047 (100  $\mu$ M). After a 15 min pre-incubation of the antagonist in the dish, increasing concentrations of DTG were superfused together with BD 1047. The current block by DTG was not modified by the  $\sigma_1$  receptor antagonist (Kruskal–Wallis test,  $P=0.93$ ), similar to what was observed in slices (Fig. 2D). Its  $IC_{50}$ s were  $231 \pm 29$  ( $n=3$ ) and  $212 \pm 25$  ( $n=4$ ) in SK2 and SK3 cell lines, respectively. Moreover, two other sigma receptor ligands tested in slices, PRE-084 (100  $\mu$ M) and 5-bromo-tetrahydroisoquinolinybenzamide (10  $\mu$ M), also had little or no effect on SK currents in transfected cells. Current amplitudes in the presence of PRE-084 were  $96.8 \pm 2.0$  ( $n=6$ ) and  $95.9 \pm 0.9\%$  ( $n=5$ ) of control, for SK2 and SK3, respectively. In the case of 5-bromo-tetrahydroisoquinolinybenzamide, these amplitudes were  $91.8 \pm 2.5$  ( $n=6$ ) and  $95.7 \pm 0.6\%$  ( $n=5$ ), respectively.

#### 4. Discussion

Our intracellular experiments in slices show that, among the  $\sigma$  receptor agonists tested, DTG is the only one that induces a consistent, concentration-dependent inhibition of the SK mediated mAHP in dopaminergic neurons. The effect of DTG on the apamin-sensitive mAHP is not dependent on  $\sigma_1$  receptor activation as it is not antagonized by the  $\sigma_1$  receptor antagonists BD1047 or haloperidol. Furthermore, the experiments with the  $\sigma_2$  receptor ligand 5-bromo-tetrahydroisoquinolinybenzamide show that  $\sigma_2$  receptors are not involved in the inhibitory effect of DTG, as the compound has no inhibitory effect by itself on the mAHP and does not antagonize the effect of DTG.

There is a great variability in the literature concerning the concentrations or doses of DTG used to explore its putative  $\sigma$  effects. In fact, doses range from 0.03 mg/kg I.V. (Monnet et al., 1990) or 0.1 mg/kg S.C. (Maurice et al., 1999) to 20 mg/kg S.C. (Bejanian et al., 1991) in *in vivo* studies and concentrations range from 10 nM (Fletcher et al., 1993; Wilke et al., 1999; Moison et al., 2003; Katnik et al., 2006) to 100  $\mu$ M (Hayashi et al., 1999) in *in vitro* studies. Thus, the concentrations of DTG used in this study are high but not unusual for *in vitro* experiments.

In agreement with our results, other studies have also suggested that some effects of DTG are not mediated by the activation of  $\sigma$  receptors (Bejanian et al., 1991; DeHaven-Hudkins and Fleissner, 1992) and an action on  $K^+$  channels and ligand-gated ion channels has been suggested, with a dubious relationship to  $\sigma$  receptor occupation (Galligan et al., 1989; Nguyen et al., 1998). The fact that DTG also affected parameters of action potential waveform in some cells suggests that SK channels are probably not the only ion channels affected by DTG. Taken together, the results of our study and those of the previous ones indicate that low doses/concentrations of  $\sigma$  receptor agonists should be used and antagonism by a specific  $\sigma$  receptor antagonist should be documented before concluding that an effect is mediated by these receptors.

Patch-clamp experiments in transfected cells confirmed that DTG most probably produces a direct inhibition of SK2 and SK3 currents, since its effect was also not affected by BD 1047 at concentrations similar to those used in slices. Moreover, inhibitory concentrations of DTG in cell lines are in the same order of magnitude as those in slices.

The nature of the inhibition induced by DTG remains to be established. Quite interestingly, we recently gathered evidence that DTG does not act on the same site as apamin and *N*-methyl-laudanosine (Lamy et al., unpublished). The inhibition of the current is not voltage-dependent. The most probable reason for this is that the binding site for DTG lies outside of the electrical field. Alternatively, it may bind within the field, but be insensitive to it because of a lack of permanent charge. This is unlikely, however, because the estimated  $pK_a$  of the guanidine moiety of the molecule estimated by the SPARC on-line calculator (Hilal et al., 1995) is 9.92, meaning that >99% of the molecules bear a positive

charge at physiological pH. DTG may turn out to be an interesting additional tool to study the biophysics of SK channels.

This study was initiated following the report that  $\sigma_1$  receptor activation increases NMDA responses and long-term potentiation by preventing SK channel opening in rat hippocampus (Martina et al., 2007). Our results do not confirm a similar interaction between  $\sigma$  receptors and SK channels in midbrain dopaminergic neurons. Martina et al. found that the effect of (+)-pentazocine on NMDA currents is similar to that of apamin and can be reversed by haloperidol. (+)-pentazocine was not used in our study, as it is very difficult to obtain in European countries due to regulation issues. However, several other prototypical  $\sigma$  receptor ligands had no effect on the mAHP in dopaminergic neurons, strongly suggesting that the interaction described in the hippocampus does not occur in the midbrain. It is quite likely that different mechanisms regulate SK channel activation in various brain regions. This may be due to the existence of different molecular species of SK channels, homomers of the various subunits and/or various types of heteromers.

In conclusion, we have demonstrated that DTG inhibits SK channels in brain slices and transfected cell lines via a direct action on the channels. This non- $\sigma$  receptor mediated effect of DTG should be considered when interpreting pharmacological effects of high concentrations of this compound.

#### Acknowledgements

The technical assistance of C Gillissen and L Massotte is gratefully acknowledged. This work was supported by grant no 9.4560.03 from the F.R.S.-FNRS (VS, JS-M. and J-F L), by a grant from the Belgian Science Policy (IAP P6/31) (VS) and by a grant from the “Fonds Facultaire de la Recherche” of the Faculty of Medicine of the University of Liège (VS). CL was supported by a «FIRST-DEI» grant (no 516131) from the Walloon region of Belgium. J-FL is a Research Director of the F.R.S.-FNRS. We thank Prof. Neil Marrion (Department of Physiology and Pharmacology, University of Bristol, UK), for providing us with the SK plasmids.

#### References

- Aydar, E., Palmer, C.P., Klyachko, V.A., Jackson, M.B., 2002. The Sigma receptors as a ligand-regulated auxiliary potassium channel subunit. *Neuron* 34, 399–410.
- Bastianetto, S., Rouquier, L., Perrault, G., Sanger, D.J., 1995. DTG-induced circling behaviour in rats may involve the interaction between sigma sites and nigrostriatal dopaminergic pathways. *Neuropharmacology* 34, 281–287.
- Bejanian, M., Pechnick, R.N., Bova, M.P., George, R., 1991. Effects of subcutaneous and intracerebroventricular administration of the sigma receptor ligand 1,3-Di-*o*-tolylguanidine on body temperature in the rat: interactions with BMY 14802 and rimcazole. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 258, 88–93.
- Bildl, W., Strassmaier, T., Thurm, H., Andersen, J., Eble, S., Oliver, D., Knipper, M., Mann, M., Schulte, U., Adelman, J.P., Fakler, B., 2004. Protein kinase CK2 is coassembled with small conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels and regulates channel gating. *Neuron* 43, 847–858.
- Blank, T., Nijholt, I., Kye, M.J., Spiess, J., 2004. Small conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels as targets of CNS drug development. *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.* 3, 161–167.
- Bouchard, P., Quirion, R., 1997. [ $^3H$ ]1, 3-di(2-tolyl)guanidine and [ $^3H$ ](+)pentazocine binding sites in the rat brain: autoradiographic visualization of the putative sigma1 and sigma2 receptor subtypes. *Neuroscience* 76, 467–477.
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Demeneix, B., Behr, J. P., 1995. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 7297–7301.
- Ceci, A., Smith, M., French, E.D., 1988. Activation of the A10 mesolimbic system by the sigma-receptor agonist (+)-SKF10047 can be blocked by rimcazole, a novel putative antipsychotic. *Eur. J. Pharmacol.* 154, 53–57.
- Debonnel, G., 1993. Current hypotheses on Sigma receptors and their physiological role: possible implications in psychiatry. *J. Psychiatry Neurosci.* 18, 157–172.
- DeHaven-Hudkins, D.L., Fleissner, L.C., 1992. Competitive interactions at [ $^3H$ ]1,3-di(2-tolyl)guanidine (DTG)-defined sigma recognition sites in guinea pig brain. *Life Sci.* 50, PL65–PL70.
- Engberg, G., Wikstrom, H., 1991. Sigma-receptors: implication for the control of neuronal activity of nigral dopamine-containing neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 201, 199–202.
- Faber, E.S., 2009. Functions and modulation of neuronal SK channels. *Cell Biochem. Biophys.* 55, 127–139.

- Fletcher, E.J., Church, J., Abdel-Hamid, K., MacDonald, J.F., 1993. Selective reduction of N-methyl-D-aspartate-evoked responses by 1, 3-di(2-tolyl)guanidine in mouse and rat cultured hippocampal pyramidal neurones. *Br. J. Pharmacol.* 109, 1196–1205.
- Galligan, J.J., Campbell, B.G., Kavanaugh, M.P., Weber, E., North, R.A., 1989. 1, 3-Di(2-tolyl)guanidine blocks nicotinic response in guinea pig myenteric neurones. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 251, 169–174.
- Goldberg, J.A., Wilson, C.J., 2005. Control of spontaneous firing patterns by the selective coupling of calcium currents to calcium-activated potassium currents in striatal cholinergic interneurons. *J. Neurosci.* 25, 10230–10238.
- Gonzalez, G.M., Werling, L.L., 1997. Release of [<sup>3</sup>H]dopamine from guinea pig striatal slices is modulated by sigma1 receptor agonists. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 356, 455–461.
- Hallworth, N.E., Wilson, C.J., Bevan, M.D., 2003. Apamin-sensitive small conductance calcium-activated potassium channels, through their selective coupling to voltage-gated calcium channels, are critical determinants of the precision, pace, and pattern of action potential generation in rat subthalamic nucleus neurons *in vitro*. *J. Neurosci.* 23, 7525–7542.
- Hanner, M., Moebius, F.F., Flandorfer, A., Knaus, H.G., Striessnig, J., Kempner, E., Glossmann, H., 1996. Purification, molecular cloning, and expression of the mammalian sigma1-binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 8072–8077.
- Hayashi, T., Su, T.P., 2005. The potential role of sigma-1 receptors in lipid transport and lipid raft reconstitution in the brain: implication for drug abuse. *Life Sci.* 77, 1612–1624.
- Hayashi, T., Su, T.P., 2007. Promoting the expression of anti-apoptotic Bcl-2: roles of endoplasmic reticulum protein sigma-1 receptor. Abstract 168.2 2007 Neuroscience Meeting, San Diego, CA.
- Hayashi, T., Su, T.P., Kagaya, A., Nishida, A., Shimizu, M., Yamawaki, S., 1999. Neuroleptics with differential affinities at dopamine D2 receptors and sigma receptors affect differently the N-methyl-D-aspartate-induced increase in intracellular calcium concentration: involvement of protein kinase. *Synapse* 31, 20–28.
- Hilal, S., Karickhoff, S.W., Carreira, L.A., 1995. A rigorous test for SPARC's chemical reactivity models: estimation of more than 4300 ionization pKas. *Quant. Struct.-Act. Relat.* 14, 348–355.
- Hugues, M., Romey, G., Duval, D., Vincent, J.P., Lazdunski, M., 1982. Apamin as a selective blocker of the calcium-dependent potassium channel in neuroblastoma cells: voltage-clamp and biochemical characterization of the toxin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 1308–1312.
- Katnik, C., Guerrero, W.R., Pennypacker, K.R., Herrera, Y., Cuevas, J., 2006. Sigma-1 receptor activation prevents intracellular calcium dysregulation in cortical neurons during *in vitro* ischemia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 319, 1355–1365.
- Kohler, M., Hirschberg, B., Bond, C.T., Kinzie, J.M., Marrion, N.V., Maylie, J., Adelman, J.P., 1996. Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. *Science* 273, 1709–1714.
- Liégeois, J.-F., Mercier, F., Graulich, A., Graulich-Lorge, F., Scuvée-Moreau, J., Seutin, V., 2003. Modulation of small conductance calcium-activated potassium (SK) channels: a new challenge in medicinal chemistry. *Curr. Med. Chem.* 10, 625–647.
- Mach, R.H., Huang, Y., Freeman, R.A., Wu, L., Vangveravong, S., Luedtke, R.R., 2004. Conformationally-flexible benzamide analogues as dopamine D3 and  $\sigma_2$  receptor ligands. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14, 195–202.
- Martina, M., Turcotte, M.E., Halman, S., Bergeron, R., 2007. The sigma-1 receptor modulates NMDA receptor synaptic transmission and plasticity via SK channels in rat hippocampus. *J. Physiol.* 578, 143–157.
- Matsumoto, R.R., Bowen, W.D., Tom, M.A., Vo, V.N., Truong, D.D., De Costa, B.R., 1995. Characterization of two novel sigma receptor ligands: antidystonic effects in rats suggest sigma receptor antagonism. *Eur. J. Pharmacol.* 280, 301–310.
- Maurice, T., Phan, V.L., Noda, Y., Yamada, K., Privat, A., Nabeshima, T., 1999. The attenuation of learning impairments induced after exposure to CO or trimethyltin in mice by sigma (sigma) receptor ligands involves both sigma1 and sigma2 sites. *Br. J. Pharmacol.* 127, 335–342.
- Minabe, Y., Matsuno, K., Ashby, C.R., 1999. Acute and chronic administration of the selective sigma1 receptor agonist SA4503 significantly alters the activity of midbrain dopamine neurons in rats: an *in vivo* electrophysiological study. *Synapse* 33, 129–140.
- Moison, D., De Deurwaerdère, P., Cagnotto, A., Marrazzo, A., Prezzavento, O., Ronsisvalle, G., Mennini, T., Spampinato, U., 2003. Intrastriatal administration of sigma ligands inhibits basal dopamine release *in vivo*. *Neuropharmacology* 45, 945–953.
- Monnet, P.F., 2005. Sigma-1 receptor as regulator of neuronal intracellular Ca<sup>2+</sup>: clinical and therapeutic relevance. *Biol. Cell* 97, 873–883.
- Monnet, F.P., Debonnel, G., Junien, J.L., De Montigny, C., 1990. N-methyl-D-aspartate-induced neuronal activation is selectively modulated by sigma receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 179, 441–445.
- Nguyen, V.H., Ingram, S.L., Kassiou, M., Christie, M.J., 1998. Sigma-binding site ligands inhibit K<sup>+</sup> currents in rat locus coeruleus neurons *in vitro*. *Eur. J. Pharmacol.* 361, 157–163.
- Pedarzani, P., Mosbacher, J., Rivard, A., Cingolani, L.A., Oliver, D., Stocker, M., Adelman, J.P., Fakler, B., 2001. Control of electrical activity in central neurons by modulating the gating of small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. *J. Biol. Chem.* 276, 9762–9769.
- Peitersen, T., Hougaard, C., Jespersen, T., Jørgensen, N.K., Olesen, S.P., Grunnet, M., 2006. Subtype-specific, bi-component inhibition of SK channels by low internal pH. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343, 943–949.
- Rothman, R.B., Reid, A., Mahboubi, A., Kim, C.H., De Costa, B.R., Jacobson, A.E., Rice, K.C., 1990. Labeling by [<sup>3</sup>H]1, 3-Di(2-tolyl)guanidine of two high affinity binding sites in Guinea pig brain: evidence for allosteric regulation by calcium channel antagonists and pseudoallosteric modulation by sigma ligands. *Mol. Pharmacol.* 39, 222–232.
- Sah, P., 1996. Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> currents in neurones: types, physiological roles and modulation. *Trends Neurosci.* 19, 150–154.
- Scuvée-Moreau, J., Liégeois, J.-F., Massotte, L., Seutin, V., 2002. Methyl-laudanosine: a new pharmacological tool to investigate the function of small-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302, 1176–1183.
- Scuvée-Moreau, J., Boland, A., Graulich, A., Van Overmeire, L., D'Hoedt, D., Graulich-Lorge, F., Thomas, E., Abras, A., Stocker, M., Liégeois, J.-F., Seutin, V., 2004. Electrophysiological characterization of the SK channel blockers methyl-laudanosine and methyl-noscapine in cell lines and rat brain slices. *Br. J. Pharmacol.* 143, 753–764.
- Seutin, V., Scuvée-Moreau, J., Dresse, A., 1997. Evidence for a non-GABAergic action of quaternary salts of bicuculline on dopaminergic neurones. *Neuropharmacology* 36, 1653–1657.
- Seutin, V., Mkahli, F., Massotte, L., Dresse, A., 2000. Calcium release from internal stores is required for the generation of spontaneous hyperpolarizations in dopaminergic neurons of neonatal rats. *J. Neurophysiol.* 83, 192–197.
- Shepard, P.D., Bunney, B.S., 1991. Repetitive firing properties of putative dopamine-containing neurons *in vitro*: regulation by an apamin-sensitive Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> conductance. *Exp. Brain Res.* 86, 141–150.
- Soh, H., Park, C.S., 2002. Localization of divalent cation-binding site in the pore of a small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel and its role in determining current-voltage relationship. *Biophys. J.* 83, 2528–2538.
- Stocker, M., Pedarzani, P., 2000. Differential distribution of three Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel subunits, SK1, SK2, and SK3, in the adult rat central nervous system. *Mol. Cell. Neurosci.* 15, 476–493.
- Su, T.P., Hayashi, T., 2003. Understanding the molecular mechanism of sigma-1 receptors: towards a hypothesis that sigma-1 receptors are intracellular amplifiers for signal transduction. *Curr. Med. Chem.* 10, 2073–2080.
- Vilner, B.J., Bowen, W.D., 2000. Modulation of cellular calcium by sigma-2 receptors: release from intracellular stores in human SK-N-SH neuroblastoma cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 292, 900–911.
- Walker, J.M., Bowen, W.D., Walker, F.O., Matsumoto, R.R., De Costa, B., Rice, K.C., 1990. Sigma receptors: biology and function. *Pharmacol. Rev.* 42, 355–402.
- Waroux, O., Massotte, L., Alleva, L., Graulich, A., Thomas, E., Liégeois, J.-F., Scuvée-Moreau, J., Seutin, V., 2005. SK channels control the firing pattern of midbrain dopaminergic neurons *in vivo*. *Eur. J. Neurosci.* 22, 3111–3121.
- Wilke, R.A., Lupardus, P.J., Grandy, D.K., Rubinstein, M., Low, M.J., Jackson, M.B., 1999. K<sup>+</sup> channel modulation in rodent neurohypophysial nerve terminals by sigma receptors and not by dopamine receptors. *J. Physiol.* 517 (Pt 2), 391–406.
- Wolfart, J., Roeper, J., 2002. Selective coupling of T-type calcium channels to SK potassium channels prevents intrinsic bursting in dopaminergic midbrain neurons. *J. Neurosci.* 22, 3404–3413.
- Wolfart, J., Neuhoff, H., Franz, O., Roeper, J., 2001. Differential expression of the small-conductance, calcium-activated potassium channel SK3 is critical for pacemaker control in dopaminergic midbrain neurons. *J. Neurosci.* 21, 3443–3456.
- Womack, M.D., Chevez, C., Khodakhah, K., 2004. Calcium-activated potassium channels are selectively coupled to P/Q-type calcium channels in cerebellar Purkinje neurons. *J. Neurosci.* 24, 8818–8822.
- Xia, X.M., Fakler, B., Rivard, A., Wayman, G., Johnson-Pais, T., Keen, J.E., Ishii, T., Hirschberg, B., Bond, C.T., Lutsenko, S., Maylie, J., Adelman, J.P., 1998. Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature* 395, 503–507.
- Zhang, J., Chiodo, L.A., Wettstein, J.G., Junien, J.L., Freeman, A.S., 1992. Acute effects of sigma ligands on the electrophysiological activity of rat nigrostriatal and mesoaccumbal dopaminergic neurons. *Synapse* 11, 267–278.