UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Programa de Doctorado: Investigación en Cáncer (Mención de Calidad)

Determinantes moleculares de la modulación de la apertura y cierre del canal de K^+ hERG por dominios citoplásmicos.

Tesis Doctoral

Jorge Fernández Trillo

Oviedo, 2014

RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Determinantes moleculares de la modulación de la apertura y cierre del canal de K+ hERG por dominios citoplásmicos.	Inglés: Molecular determinants of hERG K+ channel gating modulation by cytoplasmic domains

2.- Autor	
Nombre: JORGE FERNANDEZ TRILLO	
Programa de Doctorado: Biología funcional y molecular (interdepartamental)	
Órgano responsable: INSTITUTO UNIVERSITARIO DE ONCOLOGÍA	

RESUMEN (en español)

El canal humano hERG pertenece a la familia *eag* (KCNH) de canales de potasio dependientes de voltaje. Debido a su peculiar comportamiento como "rectificador anómalo", hERG juega un papel crucial en la finalización del potencial de acción ventricular cardíaco, pero también un papel fundamental en la fisiopatología de diversos tipos de células nerviosas, endrocrinas y tumorales.
Mientras que los sensores de voltaje y los componentes de la maquinaria de apertura y cierre de los canales de K^+ dependientes de voltaje se sitúan en el cuerpo central de la proteína, en los últimos años se ha reconocido que los mecanismos de activación y cierre implican también a los dominios amino y carboxilo terminales. En el caso de hERG la presencia de estos largos dominios es una clave para su normal apertura y cierre y para la modulación de su actividad por estímulos hormonales. Sin embargo, aún se desconoce la contribución relativa de cada dominio citoplásmico a los cambios conformacionales asociados a la apertura y el cierre de este canal.

En esta Tesis, nos hemos centrado en el estudio de la arquitectura molecular de los dominios citoplásmicos de hERG mediante FRET, así como en la mejor comprensión de la relevancia de dichos dominios, particularmente del dominio *eag* en el extremo amino terminal, en los fenómenos de apertura y cierre del canal.

En primer lugar, con el fin de confirmar el posicionamiento relativo de proteinas fluorescentes introducidas en distintas posiciones de la secuencia de hERG, hemos desarrollado la combinación TIRF-FRET a fin de obtener datos fluorimétricos correspondientes a canales totalmente funcionales y correctamente ensamblados en la membrana plasmática. Hemos podido validar así los datos obtenidos previamente en nuestro laboratorio a partir de las mediciones de FRET en condiciones de epifluorescencia y con la señal procedente del total de la célula.

En segundo lugar, mediante el uso de colorantes ($DiBAC_4(5)$ y DPA) que se mueven entre las dos hemicapas de la membrana plasmática en respuesta a cambios de voltaje, hemos estimado las variaciones del nivel de FRET entre dichos colorantes y proteínas fluorescentes introducidas en distintas posiciones del canal hERG. Los resultados obtenidos con la DPA mostraron un mayor nivel de FRET con las construcciones portando la proteína fluorescente en el extremo amino que en el carboxilo, observándose niveles intermedios con los fluoróforos introducidos en otras posiciones de la secuencia del canal.

Finalmente, hemos comprobado que un fragmento recombinante correspondiente al dominio *eag* es capaz de recuperar la funcionalidad de canales que presentan alteraciones estructurales en el extremo amino. Esta recuperación se pierde en presencia de mutaciones puntuales tanto en el lazo S4-S5 como en los primeros residuos del dominio *eag*. Además, en todos los casos en que se observó recuperación funcional, se observó también un considerable nivel de FRET en condiciones de TIRF entre el fragmento *eag* recombinante y el canal, mientras que en aquellos casos en los que no se obtuvo recuperación funcional, no se observaron niveles apreciables de FRET.

FOR-MAT-VOA-010-BIS

RESUMEN (en Inglés)

The human hERG channel belongs to the *eag* (KCNH) voltage-dependent potassium channel family. Due to its particular behaviour as an "inward rectifier", hERG plays a crucial role in the finalization of the ventricular cardiac action potential, but also an important role in the physiopathology of several nervous, endocrine and tumoral cells.
The voltage sensors and the gating machinery components of the voltage_dependent K+ channels are located in the channel core. However, in the last years an important role of the amino- and carboxy-terminus domains in the channel gating processes has been recognized. In the case of hERG, the presence of these long domains is crucial for normal gating and for modulation of channel activity by hormonal stimuli. Nervertheless, the relative contribution of individual cytoplasmic domains to conformational changes associated to channel gating is still unknown.

This Thesis is focused on the study of the molecular architecture of hERG cytoplasmic domains using FRET and on getting a better knowledge of the relevance of these domains (in particular the *eag* domain of the amino-terminus) for channel gating.

First, to confirm the relative positioning of fluorescent proteins introduced at different levels in the hERG sequence, we implemented a TIRF-FRET combination to obtain fluorimetric data corresponding to correctly assembled and functional channels in the plasma membrane. Thus, we have been able to confirm and validate our previous conclusions obtained using FRET measurements under epifluorescence conditions in which data were collected from the whole cell.

Second, using two dyes ($DiBAC_4(5)$ and DPA) that move across the plasma membrane in response to voltage changes, we have quantified FRET level between such dyes and fluorescent proteins located at different positions of the hERG channel. The sequence DPA results demonstrated that the FRET levels were higher with constructions carrying the fluorescent protein in the amino-terminus as compared to those in which the fluorescent protein is located in the carboy-terminus. Intermediate FRET levels where observed when the fluorescent label was located in other positions of the channel sequence.

Finally, we have demonstrated that a recombinant protein fragment corresponding to the hERG *eag* domain is able to restore normal gating of channels carrying structural alterations in the amino-terminus. This recovery is abolished when point mutations are introduced in the S4-S5 loop or the first residues of the *eag* domain. In all cases in which functional recovery was achieved, a significant level of FRET between fluorescently labeled recombinant *eag* fragment and channel was also observed under TIRF conditions. This FRET was almost negligible when constructs exhibiting no functional recovery were used.

Agradecimientos

En primer lugar quisiera expresar mis agradecimientos a mis directores de tesis, los Doctores Francisco Barros de la Roza y Pilar de la Peña Cortines por toda la guía, enseñanzas, ayuda y constante apoyo que han permitido el desarrollo de este trabajo. Por su puesto también por su inmejorable trato personal y su gran amabilidad que me han hecho se sentir en el laboratorio como en casa.

También dar mis sinceros agradecimientos a los demás componentes del grupo: el Doctor Pedro Domínguez por sus consejos y ayuda ; la Doctora Ángeles Machín; Luis Carretero, capaz de hacer reír por las cosas más inverosímiles; y Teresa González, una excelente técnico de laboratorio (y no lo digo yo) por su ayuda, su compañía y hasta por reñirme por mi desorden.

Agradecer además a todos los miembros anteriores del grupo, muy especialmente al Doctor Pablo Miranda cuyo trabajo ha sido punto de partida de éste.

A la Doctora Luisa María Sierra por participar como tutora en las etapas iniciales de este trabajo.

A los Doctores Teresa Giráldez y Pedro Sánchez Lazo por la generosa donación de los plásmidos Rho-pYC y pEGFP respectivamente.

A todos los compañeros del Departamento con los que he compartido buenos momentos, que me han brindado su ayuda y a los que muchos de ellos hoy puedo llamar amigos, en especial a: Fernando, uno de los mejores amigos que uno puede tener y mejor persona, al que espero tener que seguir “aguantando” muchos años más; Clara, por su sinceridad y decir las cosas tal como son (aunque a veces caigan como cuchillos); Montse, una grandísima amiga que siempre ha estado ahí dando ánimos al desarrollo de este trabajo; Bea, a la que siempre llevo la contraria pero aún así me soporta; Lorea, por sus visitas al laboratorio a para animar y charlar un ratillo; Julián, por esas rutas por el monte junto con Fernando que me han permitido desconectar.

En general a todos aquellos compañeros o amigos que de una manera u otra, directa e indirectamente con su ayuda, sus consejos, o incluso sus bromas y chanzas hayan contribuido al desarrollo de esta Tesis y a que ésta haya sido una experiencia agradable.

Al Doctor Alejandro López Soto, por su guía en mis primeros pasos en el mundo científico y terminar de convencerme para que me dedicase a este mundo.

Muy especialmente a mis padres, mi hermano y mis abuelos, por todo su apoyo y cariño.

Índice

ÍNDICE i

ABREVIATURAS v

INTRODUCCIÓN 1

1. *El CANAL DE POTASIO hERG.* 3

1.2 Características estructurales de hERG 3

2. *IMPORTANCIA FISIOLÓGICA DE LOS CANALES ERG.* 6

2.1 Canales ERG y la repolarización del potencial de acción cardíaco. 6

2.2 Canales ERG en el sistema nervioso y en las células neuroendocrinas. 7

2.3 Canales ERG en células tumorales. 8

3. *CARACTERÍSTICAS BIOFÍSICAS de hERG.* 10

3.1 El papel de los dominios citoplásmicos en la apertura y cierre de hERG. 13

4. *TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS EN EL CONOCIMIENTO DE LA ARQUITECTURA MOLECULAR DE LOS DOMINIOS CITOPLÁSMICOS DE hERG.* 15

4.1. Transferencia de energía de fluorescencia por resonancia (FRET) 16

4.2. Uso de proteínas fluorescentes como fluoróforos biológicos. 19

4.3 Uso de FRET en la medida de distancias intra e intermoleculares. 20

4.5 Fluorescencia por reflexión total interna (TIRF) y su combinación con FRET. 22

OBJETIVOS 25

MATERIALES Y MÉTODOS 29

1. *PLÁSMIDOS RECOMBINANTES.* 31

2. *GENERACIÓN DE DISTINTAS CONSTRUCCIONES DEL CANAL hERG PORTANDO MUTACIONES Y DELECIONES.* 32

3. *GENERACIÓN DE CONSTRUCCIONES QUE CONTIENEN FRAGMENTOS RECOMBINANTES DEL DOMINIO EAG.* 33

4. *TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE E.COLI Y PURIFICACIÓN DEL DNA PLASMÍDICO.* 35

5. *CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES Y TRANSFECCIÓN TRANSITORIA.* 35

6. *REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).* 36

7. *MUTAGÉNESIS DIRIGIDA MEDIANTE PCR.* 36

8. *MEDIDAS ELECTROFISIOLÓGICAS.* 38

9. *DETECCIÓN DE INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA MEDIANTE FRET.* 39

9.1. Descripción del equipo de FRET. 39

9.2 Medidas de FRET en condiciones de epifluorescencia. 41

9.3 Combinación de TIRF-FRET. 43

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO. 43

RESULTADOS 45

1. *TIRF-FRET EN EL ESTUDIO DE LA ARQUITECTURA MOLECULAR DE LOS DOMINIOS CITOPLÁSMICOS DE hERG.* 47

1.1 Implementación de un sistema de TIRF. 47

1.2 Combinación del sistema de TIRF con la tecnología de FRET. 50

1.3 Ausencia de fotoconversión de YFP a CFP en condiciones de TIRF. 52

1.4 Ausencia de TIRF/FRET entre proteínas no interaccionantes. 53

1.5 Cuantificación de los niveles de FRET en condiciones de TIRF y comparación con los niveles obtenidos en epifluorescencia. 54

2. *ESTIMACIÓN DE LAS DISTANCIAS ENTRE FLUORÓFOROS INSERTADOS EN DIFERENTES POSICIONES DE hERG Y LA MEMBRANA PLASMÁTICA*. 59

2.1 Mecanismos de atenuación mediante FRET de la señal de un donador (YFP) por el aceptor $DiBAC_4(5)$ o DPA. 59

2.2 Efecto del $DiBAC_4(5)$ sobre la fluorescencia de la YFP. 61

2.3 Posible contribución de la titulación potenciométrica del $DiBAC_4(5)$ a la atenuación de la fluorescencia de la YFP. 67

2.4 Efecto de la DPA sobre la fluorescencia de una molécula de GFP anclada a la membrana plasmática. 70

2.5 La disminución de la fluorescencia inducida por la DPA varía en función del fluoróforo utilizado como donador de FRET. 73

2.6 Efecto de la DPA sobre la fluorescencia de la YFP insertada en distintas posiciones del canal hERG. 75

3. *DETERMINANTES MOLECULARES DE LA INTERACCIÓN ENTRE EL DOMINIO AMINO-TERMINAL Y EL CUERPO CENTRAL DEL CANAL hERG*. 82

3.1 El fragmento recombinante N1-135/YFP recupera el cierre lento de canales hERG con alteraciones estructurales en el extremo amino. 83

3.2 La recuperación de la lenta cinética de cierre mediada por el dominio recombinante eag depende del lazo S4-S5. 87

3.3 Mutaciones en los residuos iniciales del dominio eag recombinante anulan la recuperación del cierre lento en canales hERG Δ2-135. 89

3.4 Mutaciones LQT2 en el dominio eag recombinante también impiden la recuperación del cierre lento en canales hERG Δ2-135. 90

3.5 Detección mediante FRET de interacciones entre el canal y el dominio recombinante eag. 92

3.6 Efecto de mutaciones en el lazo S4-S5 y en el extremo amino del fragmento eag recombinante sobre los niveles de TIRF/FRET. 92

3.7 El fragmento recombinante N1-135 codificado en un RNA bicistrónico recupera el cierre lento de canales hERG con alteraciones estructurales en el extremo amino... 94

3.8 El fragmento recombinante N1-15 codificado en un RNA bicistrónico compite con el dominio eag endógeno en la interacción con el cuerpo central del canal. 95

DISCUSIÓN..... 99

1. *ESTIMACIÓN MEDIANTE FRET DE DISTANCIAS RELATIVAS DE DISTINTAS ETIQUETAS INTRODUCIDAS EN hERG RESPECTO A LA MEMBRANA PLASMÁTICA.*..... 101

2. *RECONSTRUCCIÓN DE LAS PROPIEDADES FUNCIONALES DE hERG CON FRAGMENTOS RECOMBINANTES. MAPEO DE LOS DETERMINANTES MOLECULARES DE LA MODULACIÓN DEL CANAL POR DOMINIOS CITOPLÁSMICOS.*..... 105

3. *RELACIÓN ENTRE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN NUESTRO TRABAJO Y LOS DATOS RECIENTES DE OTROS AUTORES.* 109

CONCLUSIONES 115

REFERENCIAS..... 119

PUBLICACIONES 131

Abreviaturas

agERG: ERG de *Anopheles gambiae*

CFP: "Cyan fluorescent protein" o proteína fluorecente cian

CHO: Línea celular de ovario de hámster chino

cNBD: "Cyclic nucleotide binding domain" o dominio de unión a nucleótidos cíclicos

DiBAC$_4$(5): Bis-(ácido 1,3-dibutilbarbiturico) pentamethina

DMEM: Medio Eagle modificado según Dulbecco

DMSO: Dimetilsulfóxido

DPA: Dipicrilamina

EAG: "Ether-á-go-go"

E_{FRET}: Eficiencia de FRET

EGTA: Ácido etilenglicol-bis (β-amino-etiléter N,N,N´nN´-tetracético

ELK: "eag-like"

Em: Potencial de membrana

ERG: "Ether-à-go-go related gene"

F: Fluorescencia

F_0: Fluorescencia inicial

F_{CFP}: Fluorescencia de CFP

F_{YFP}: Fluorescencia de YFP

FRET: "Fluorescence resonance energy transfer" o transferencia de energía de fluorescencia por resonancia

GFP: "Green fluorescent protein" o proteína fluorescente verde

HEK293: Línea celular de riñón embrionario humano

HEPES: Ácido N-(2-hidroxietil) piperazina-N-(2-etanosulfónico)

hERG: ERG humano

I_{Kr}: Componente rápida de la corriente de K^+ rectificadora retardada cardíaca

I_{Ks}: Componente lento de la corriente de K^+ rectificadora retardada cardíaca

IRES: "Internal ribosome entry site" o sitio interno de entrada del ribosoma

IRK: Canales de K^+ rectificadores anómalos "clásicos"

PAS: "Per-Arnt-Sim"

PCR: "Polymerase chain reaction" o reacción en cadena de la polimerasa

rERG: ERG de rata

S.E.M.: Error estándar de la media

TIRF: "Total internal reflection fluorescence" o fluorescencia por reflexión total interna

TRH: "Thyrotropin-releasing hormone" u hormona liberadora de tirotropina

TRP: "Transient receptor potential"

VFP: "Venus fluorescent protein" o proteína fluorescente venus

VR: "Vanilloid receptor" o receptor de vanilloides

YFP: "Yellow fluorescent protein" o proteína fluorescente amarilla

INTRODUCCIÓN

1. El CANAL DE POTASIO hERG.

El canal hERG (del inglés ***h**uman **e**ther-à-go-go **r**elated **g**ene*) pertenece a la superfamilia de canales de potasio dependientes de voltaje, dentro de la cual, se engloba a su vez en la famila *eag* (***e**ther-**à**-**g**o-go*). Esta familia debe su nombre al primero de sus miembros identificado, el canal *eag*, que fue descrito por primera vez en *Drosophila melanogaster* a partir de una mutación en el gen que lo codifica y que causa un fenotipo peculiar, por el cual las moscas portadoras de esta mutación presentan una agitación caracterísitica de las patas al ser anestesiadas con éter. Dicha famila *eag*, se divide según su homología de secuencia en tres subfamilias denominadas *ether-à-go-go* (*eag* o *Kv10*), *eag-related gene* (*erg* o *Kv11*) y *eag-like* (*elk* o *Kv12*) (Warmke y Ganetzky 1994; Trudeau *et al*. 1995). Hasta ahora se han identificado tres miembros de la subfamilia *erg* en rata: r-*erg1*, r-*erg2* y r-*erg3* (Shi *et al*. 1997) y sus tres homólogos en humanos: h-*erg1*, h-*erg2* y h-*erg3* (Bauer *et al*. 2003). A lo largo de esta memoria, se empleará el término "hERG" para referirnos al canal codificado por el gen h-*erg1* (también denominado *Kv11.1 o KCNH2*).

1.2 Características estructurales de hERG.

La estructura básica de hERG coincide con la de otros muchos canales de potasio dependientes de voltaje y consta de un tetrámero formado por cuatro subunidades α idénticas que se coensamblan en la membrana formando un poro conductor hidrofílico (revisado en Barros *et al*. 2012), mientras que sus extremos amino y carboxilo tienen una localización citoplasmática (Figura 1). Cada una de las subunidades α está formada por un cuerpo central que constituye la parte más conservada filogenéticamente, con seis dominios hidrofóbicos transmembranales (S1 a S6). Las hélices α S5 y S6 así como el lazo que une ambas (región H5) delimitan el poro central de permeación, siendo especialmente relevante la región H5, ya que contribuye a la formación del poro y al filtro de selectividad a potasio. El dominio sensor de voltaje está constituido por los segmentos S1-S4, de los cuales el segmento S4 presenta una secuencia de aminoácidos poco frecuente, con varias repeticiones en las que se alternan dos residuos hidrofóbicos con uno cargado positivamente (lisina o arginina). Este segmento transmembranal S4, debido a su peculiar composición, tendría un papel esencial en la detección de los cambios de potencial a través de la membrana.

El cuerpo central hidrofóbico de hERG mantiene un 49% de identidad de secuencia con el del canal *eag* de *Drosophila melanogaster* (Warnke y Ganetzky 1994) y un 96% respecto a su homólogo en rata (rERG) (Bauer *et al*. 1998). Por otro lado, los dos dominios citoplásmicos correspondientes a las regiones amino y carboxilo de hERG presentan la caracterísitica

distintiva de ser particularmente largos, representando cerca del 80% de la proteína del canal y constando de unos 400 aminoácidos en cada caso, siendo el extremo amino el más largo de toda la familia *eag* así como del resto de canales de potasio dependientes de voltaje conocidos. El extremo amino se compone a su vez de dos dominios estructural y funcionalmente diferenciados: un dominio inicial que comprende los residuos 1 a 135, denominado *eag* por estar altamente conservado en toda la familia, seguido de otro dominio exclusivo de hERG que comprende los residuos 135 al 397 y que en nuestro laboratorio hemos denominado dominio proximal por su proximidad a la primera hélice transmembranal (Viloria *et al*. 2000). El dominio eag también suele denominarse eag/PAS, ya que ha sido parcialmente cristalizado comprobándose que los residuos 26 al 135 forman un dominio PAS (*Per-Arnt-Sim*) (Morais-Cabral *et al*. 1998). La región inicial correspondiente a los primeros 26 residuos estaría a su vez compuesta por dos partes estructuralmente diferenciadas, una primera mitad desestructurada y flexible correspondiente a los primeros 13-16 residuos de la proteína y una hélice α anfipática desde el aminoácido 13 al 26 (Ng *et* al. 2011; Muskett *et* al. 2011; Li *et* al. 2010). Por su parte, el extremo carboxilo es estructuralmente menos conocido, pero se ha descrito en él la presencia de una región denominada cNBD (*cyclic nucleotied binding domain*) por su homología con dominios de unión a nucleótidos cíclicos de otras proteínas o canales, así como una región denominada " C-linker" que une al cNBD con la última hélice transmembranal S6.

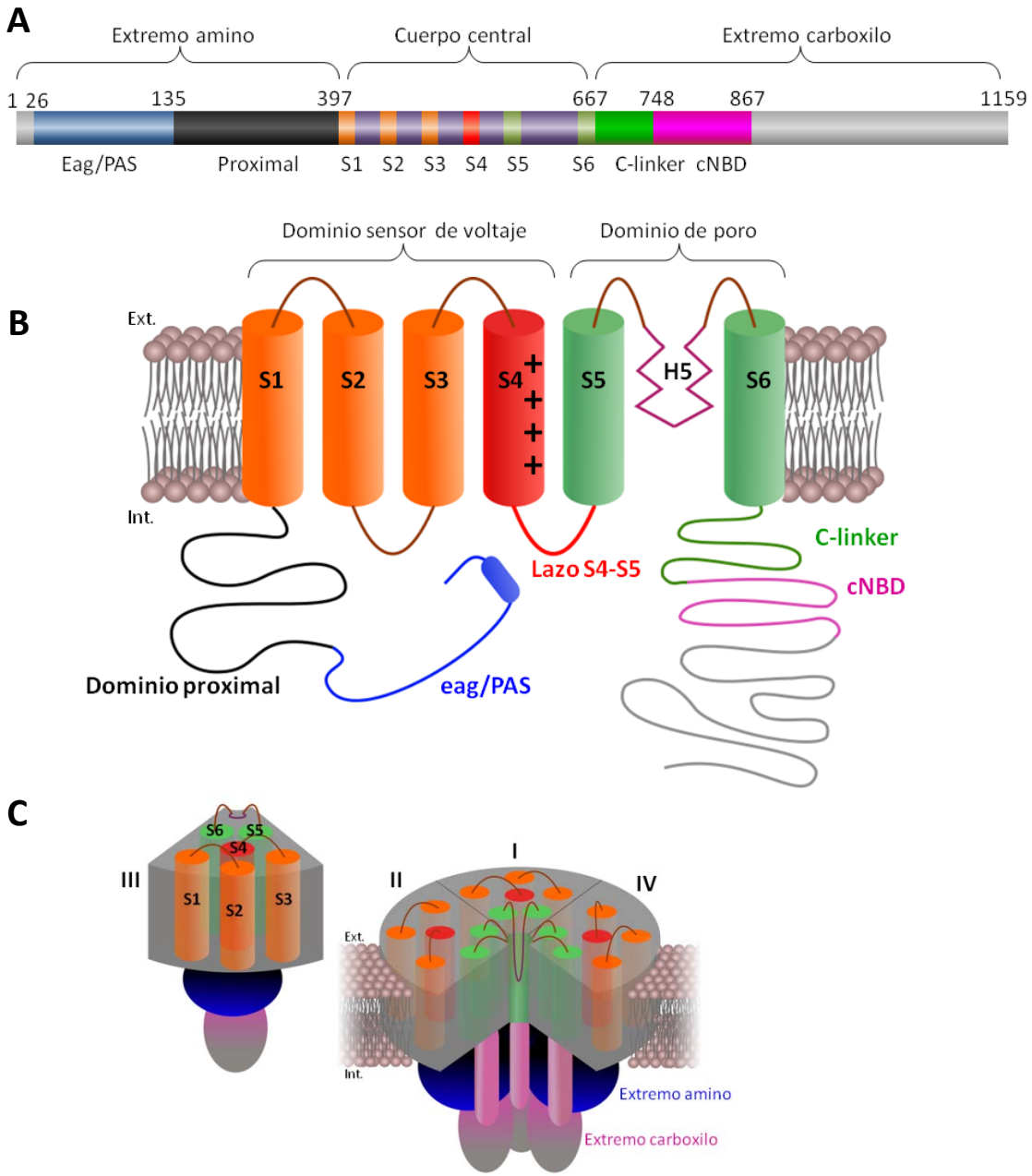


Figura 1. *Organización estructural del canal hERG. A) Esquema lineal mostrando la organización general de la proteína del canal. Los colores con los que se representa cada dominio corresponden a los empleados en los esquemas B y C. El tamaño de cada dominio se representa aproximadamente de modo proporcional a la longitud total de la proteína. B) Topología de una de las subunidades α. Se representan en el mismo plano las seis hélices α como cilindros. En la hélice S4 (en rojo) se muestra la disposición de residuos alternos con carga positiva que configuran la parte más característica del sensor de voltaje. También se indican el lazo S4-S5, la región H5 implicada en la formación del poro de permeación y los principales dominios de los extremos citoplásmicos. El pequeño cilindro azul en el extremo amino representa la hélice α anfipática (residuos 13 a 23) que separa la región PAS de la región inicial desestructurada. C) Representación esquemática de la estructura tetramérica del canal, con las subunidades α co-ensambladas en la membrana delimitando el centro del poro hidrofílico. Se muestra una de las subunidades separadas para mayor claridad. Para simplificar, la totalidad de los extremos amino y carboxilo se representan como elementos esféricos negro-azulado y rosa-grisáceo respectivamente.*

2. IMPORTANCIA FISIOLÓGICA DE LOS CANALES ERG.

La expresión de los canales ERG ha sido descrita en numerosos tipos celulares de mamíferos así como en *Drosophila* (Shi *et al*. 1997; Titus *et al*. 1997; Wang *et al*. 1997b; Wymore *et al*. 1997; Bauer *et al*. 1998; Zehelein *et al*. 2001). El estudio de las características cinéticas de estos canales en tejidos donde se expresan de modo natural como son el cardíaco, nervioso y endocrino, así como en sistemas heterólogos de expresión (oocitos de *Xenopus* y células de mamífero), han permitido ir conociendo el papel que desempeñan en diversos procesos fisiológicos, algunos de los cuales se detallarán a continuación:

2.1 Canales ERG y la repolarización del potencial de acción cardíaco.

Una de las características del potencial de acción de las células ventriculares cardíacas es su larga duración, presentando una amplia meseta en que la célula se mantiene despolarizada permitiendo el paso de iones Ca^{2+} necesarios para la contracción muscular. Esta meseta se mantiene mediante un equilibrio entre corrientes de entrada de Ca^{2+} y corrientes de salida de K^+. El lento paso de iones K^+ necesario para este fin está mediado por dos corrientes de salida, una de aparición lenta denominada IKs y otra más rápida pero reducida rápidamente llamada IKr. La corriente IKs está mediada por el canal *KvLQT1* (*Kv7.1*) asociado a la subunidad β reguladora MinK (Sanguinetti *et al*. 1996; Barhanin *et al*. 1996). Por su parte, la corriente rápida IKr está mediada por hERG probablemente asociado a otra subunidad β reguladora que podría ser MiRP1 (Abbot *et al*. 1999; Weerapura *et al*. 2002) o la propia MinK (McDonald *et al*. 1997). El hecho de que la magnitud de la corriente IKr sea pequeña durante la despolarización y aumente durante la repolarización radica en el comportamiento de hERG como rectificador anómalo (ver a continuación). Por lo cual, un correcto funcionamiento de hERG es vital junto con la corriente IKs y la activación de otra corriente tipo rectificador anómalo (IKl) para una correcta finalización del potencial de acción cardiaco (revisado en Tristani-Firouzi *et al*. 2001).

Como se acaba de comentar, un funcionamiento correcto del canal hERG es necesario para mantener la duración del potencial de acción cardíaco, por lo que un mal funcionamiento del canal producirá un alargamiento de dicho potencial que puede desembocar en arritmias, fibrilación ventricular y muerte súbita (Curran *et al*. 1995; Sanguinetti *et al*. 1995; Spector *et al*. 1996b; Whitchel y Hancox, 2000). Este aumento de la duración del potencial de acción cardíaco se manifiesta en el electrocardiograma como un aumento del intervalo entre las ondas QRS y T, que a su vez representan el comienzo y final del potencial de acción ventricular, dando lugar al denominado síndrome “QT largo” de tipo II. Este tipo de síndrome QT largo puede tener un origen hereditario o adquirido. El hereditario se debe a diversas mutaciones en el gen que codifica hERG, mientras que el adquirido suele ser consecuencia de los efectos

secundarios de diversos fármacos, ya sean antiarrítmicos de clase III como las metanosulfonoanilidas como el E-4031, el dofetilide y el MK-499 u otros fármacos no relacionados con el potencial de acción cardíaco como algunos antihistamínicos y antidiabéticos que son capaces de bloquear hERG (Roden 1998). En referencia a estos últimos es interesante resaltar que son muchos los fármacos estructuralmente diferentes capaces de bloquear hERG, con el subsiguiente peligro proarritmogénico que ello conlleva, de modo que el bloqueo de hERG es hoy en día la causa más frecuente de retirada de fármacos del mercado. De hecho, esto ha causado que la Agencia Europea para la Evaluación de Productos Médicos y otros organismos hayan publicado normativas obligando a comprobar la posible incidencia sobre el intervalo QT de todos los fármacos no cardiovasculares presentes en el mercado (Vandenberg *et al*. 2001; Raschi *et al*. 2008).

Debe indicarse que no todas las arritmias cardíacas ni todos los síndromes "QT largo" se deben a un mal funcionamiento de hERG, ya que se han identificado otros 7 tipos de síndromes "QT largos" causados por mutaciones en genes que codifican canales responsables de otras corrientes cardíacas (revisado en Moss y Kass 2005). Finalmente, además de su expresión en las células del ventrículo, hERG también se expresa abundantemente en otras zonas del corazón como el nódulo sinoatrial o la aurícula (Schram *et al*. 2002). Con todo esto se puede pensar que con pequeñas alteraciones del patrón de expresión de IKr, así como con variaciones de su magnitud o sus propiedades cinéticas se puede alterar significativamente el potencial de acción de los cardiomiocitos (Jurkiewicz y Sanguinetti. 1993).

2.2 Canales ERG en el sistema nervioso y en las células neuroendocrinas.

Aunque aún no se conoce en detalle su papel en ellos, también se ha detectado ERG en tejidos neuronales de mamíferos (Wymore *et al*. 1997). Paralelamente, se ha observado que mutaciones en el gen *erg* de *Drosophila* producen la aparición de hiperexcitabilidad neuronal (Titus *et al*. 1997; Wang *et al.* 1997b). En el caso del sistema nervioso central de rata se ha encontrado expresión de las isoformas *erg2* y *erg3* en diferentes zonas. Estas isoformas no aparecen en el tejido cardíaco. Es por ello que pese a no conocerse bien las causas de esta expresión diferencial, es posible que estos canales jueguen un papel regulador en la actividad eléctrica de distintos tipos de neuronas (Papa *et al*. 2003). Los canales ERG también se expresan en microglía (Zhou *et al*. 1998) y en astrocitos de hipocampo, donde se les ha atribuido un papel en la homeostasis del potasio y la excitabilidad neuronal (Emmi *et al*. 2000). También se han detectado corrientes que presentan unas características cinéticas y una respuesta farmacológica muy similares a las del canal ERG en una línea celular de ganglio dorsal de rata (Favarelli *et al*. 1996) donde su bloqueo causa una disminución en la adaptación

de la frecuencia de producción de potenciales de acción durante las largas series que se producen en estas células (Chiesa *et al*. 1997), lo que sugiere que la expresión de *erg* podría contribuir a la excitabilidad de algunas células neuronales en mamíferos. Otra localización donde se han podido detectar corrientes tipo ERG es en las células intersticiales de Cajal del intestino delgado donde podrían estar controlando su potencial de membrana basal así como participar en su actividad marcapasos (Zhu *et al*. 2003).

Además de su papel en la excitabilidad y actividad eléctrica, los canales ERG también se han propuesto como participantes en otros procesos, como la neuritogénesis y diferenciación neuronales (Arcangeli *et al*. 1993, 1995; Faravelli *et al*. 1996), más en concreto participando en el control de la variación del potencial de membrana basal durante los diferentes estadios de diferenciación. Así, en los primeros estadios se expresaría *erg* situando el potencial basal en torno a -50 mV, para posteriormente, en estadios más avanzados de diferenciación, ser sustituida su expresión por la de otros canales rectificadores anómalos clásicos (*IRK1*) que mantendrían el potencial basal entre -60 y -80 mV. De este modo, la expresión secuencial de ambos tipos de canales haría que el potencial basal sea menos negativo en las primeras etapas, desplazándose hacia valores más negativos conforme progresa la diferenciación (Arcangeli *et al*. 1995, 1997).

Finalmente, los canales ERG también tienen un papel reconocido en el correcto funcionamiento de células endocrinas como las células adenohipofisarias, las β-pancreáticas o las cromafines, en las que la excitabilidad es indispensable para su función fisiológica de secreción de neurotransmisores y hormonas (Corrette *et al*. 1995; Bauer *et al*. 1999; Rosati *et al*. 2000; Lecchi *et al*. 2002; Gullo *et al*. 2003). Así, el canal ERG parece ser blanco de la hormona liberadora de tirotropina (TRH) en el control de los niveles de calcio intracelular y en la secreción que presentan las células adenohipofisarias en respuesta a esta hormona (Barros *et al*. 1997). Del mismo modo, el canal actuaría como un factor crucial en el mantenimiento del potencial de membrana basal de dichas células (Barros *et al*. 1992, 1994; Bauer *et al*. 1999; Schäfer *et al*. 1999).

2.3 Canales ERG en células tumorales.

La implicación de los canales de potasio dependientes de voltaje en la proliferación celular está ampliamente aceptada, fundamentalmente tras la observación de que determinados fármacos bloqueantes de canales de potasio dependientes de voltaje pueden inhibir este proceso en determinados tipos celulares (Pardo 2004; Felipe *et al*. 2006). Además, su implicación en la división celular se ha puesto de manifiesto mediante su sobre-expresión en

varias líneas celulares, e incluso se ha visto como la sobreexpresión de canales como Eag1 y TASK favorecen la progresión tumoral en determinados modelos animales (revisado en Pardo *et al*. 2005). Inicialmente se propusieron dos teorías para explicar el papel de estos canales en la proliferación celular: el control del volumen celular y el control del potencial de membrana para transporte de nutrientes (revisado en Pardo *et al*. 2005). Sin embargo, debido a limitaciones de ambas propuestas se comenzó a sugerir que estos canales serían mucho más que un poro de iones controlado por voltaje, ya que son proteínas que responden a la despolarización con reordenamientos conformacionales, siendo la apertura del poro sólo una de las consecuencias de dichos cambios conformacionales (Kaczmarek 2006; Hegle *et al*. 2006; Downie *et al*. 2008). Adicionalmente, algunos canales forman parte de complejos supramoleculares donde funcionarían de sensor haciendo de nexo entre el medio extracelular y el interior de la célula (Pardo *et al*. 2005). En este aspecto, cobraría especial importancia el papel de los dominios citoplasmáticos. El canal hERG es uno de los canales iónicos cuyo papel en los procesos tumorales está mejor descrito, ya que se ha comprobado que su expresión se encuentra alterada en células tumorales que de algún modo regula el crecimiento neoplásico (revisado en Arcangeli 2005). Más recientemente, también se ha detectado hERG en varias líneas celulares de origen tumoral. Es interesante mencionar que se ha detectado una isoforma de hERG (hERG1B) propia de células tumorales preferentemente en fase S y cuyo extremo amino está truncado, de modo que por sus propiedades biofísicas favorece el estado despolarizado necesario en fase S. Recientemente se ha detectado expresión de hERG en varios tipos de tumores sólidos humanos como adenocarcinomas de endometrio o cáncer colorectales, siendo menor o ausente esta expresión en los corresponidentes tejidos sanos (Cherubini *et al*. 2000; Lastraioli *et al*. 2004). Además, cabe destacar que los mayores niveles de expresión de hERG se dan en cánceres metastásicos, especialmente en los tipos más agresivos.

Además de su papel en la proliferación, se ha visto que hERG participa en la invasión tumoral. Así, su bloqueo en células de cáncer de colon puede reducir significativamente la migración de éstas en Matrigel (Lastraioli *et al*. 2004). También se ha visto una interrelación del canal con la migración celular basada en su interacción con β1-integrinas (Arcangeli y Becchetti 2006). Por último, recientemente se ha visto que hERG también participa en el proceso de angiogénesis tumoral, ya que la secreción del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEFG) se reduce en presencia de inhibidores específicos de hERG (Arcangeli y Becchetti 2006).

3. CARACTERÍSTICAS BIOFÍSICAS de hERG.

El canal hERG, al igual que la mayoría de los canales de potasio dependientes de voltaje puede adoptar al menos tres conformaciones funcionales diferentes: cerrado, abierto e inactivo, siendo el estado abierto el único que permite la conducción de iones K^+. Estos tres estados se encuentran en un equilibrio que varía en función del voltaje. Así, un potencial de membrana negativo en la cara intracelular desplaza ese equilibrio hacia el estado cerrado, mientras que un potencial positivo o menos negativo favorece los estados abierto e inactivo (Figura. 2). De este modo, cuando la célula se encuentra en reposo (potencial negativo en el interior), la mayor parte de estos canales se encontrarán cerrados. Cuando por alguna circunstancia la membrana es despolarizada, es decir, su potencial se hace menos negativo, los canales se abrirán o activarán pasando al estado abierto. De un modo general, en la mayor parte de canales de potasio, esta activación ocurre muy rápidamente (en cuestión de milisegundos), de modo que la probabilidad de encontrar canales en estado abierto aumentaría, incrementándose así la conductancia de la membrana a iones K^+. Los canales que presentan este comportamiento en el que la conductancia aumenta al despolarizar presentan lo que se denomina "rectificación normal". En algunos canales, una despolarización mantenida da lugar a un proceso denominado inactivación en que ocurren cambios conformacionales que lleven al canal a un estado inactivo o no conductor. Esta inactivación también es un proceso reversible, ya que al repolarizar la membrana, los canales pueden volver a abrirse (recuperación de la inactivación) para a continuación volver al estado cerrado. Si bien estructuralmente hERG se clasifica dentro de los canales de potasio que presentan una "rectificación normal", debido a sus particulares características cinéticas, actúa como un "rectificador anómalo", ya que las corrientes detectables son mayores a potenciales negativos que positivos. Este comportamiento peculiar de hERG es debido a una combinación particular de velocidades muy lentas de apertura y cierre del canal junto con una inactivación muy rápida. Así, ante una despolarización, al abrirse muy lentamente el canal e inactivarse muy rápido, el canal estará muy poco tiempo en estado conductor y la corriente observada será mínima. Al repolarizar, el canal pasará de nuevo al estado abierto muy rápidamente. Como su velocidad de cierre es muy lenta, este estado abierto y activo se mantendrá durante bastante tiempo (Trudeau *et al*. 1995; Sanguinetti *et al*. 1995; Smith *et al*. 1996; Schönherr y Heinemann 1996; Spector *et al*., 1996a; Wang *et al*. 1997a). Debido a estos fenómenos, durante la repolarización se observa de un modo transitorio una mayor cantidad de corriente que cuando la célula es despolarizada, incluso en presencia de concentraciones fisiológicas de K^+ a las cuales el potencial de equilibrio de dicho catión estará cercano al potencial de reposo de la

célula y por tanto la fuerza ión-motriz que lo empuja es más baja que cuando la célula está a potenciales más positivos. Es importante destacar que la alteración de las cinéticas de transición entre los estados del canal puede modificar sus propiedades de rectificación. De hecho, una mutación que bloquee la inactivación del canal (como sería hERG S620T) hace que este canal mutante pase de actuar como "rectificador anómalo" a "rectificador normal" (Viloria *et al*. 2000).

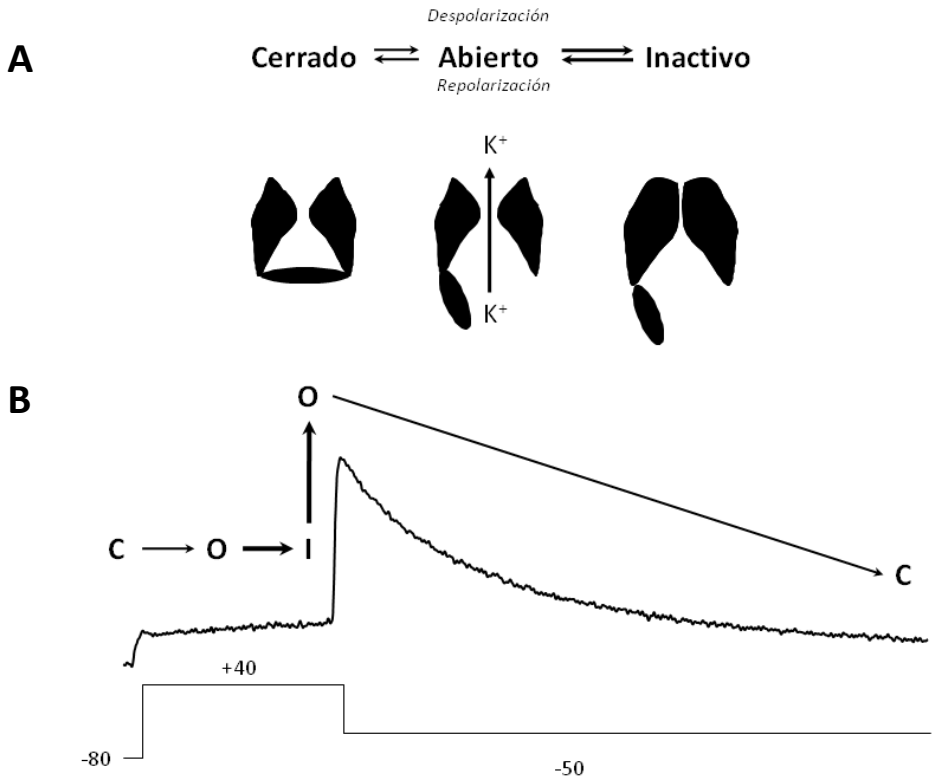


Figura 2. *Características cinéticas de hERG. A) Equilibrio conformacional entre los tres estados básicos del canal hERG: Cerrado, abierto e inactivo. Los dibujos son una representación esquemática del canal en cada uno de los tres estados. Tal como se indica con el tamaño y grosor de las flechas, la transición entre abierto e inactivo es mucho más rápida que entre abierto y cerrado. B) Registro de una corriente típica de hERG obtenida con la aplicación del protocolo de estimulación (en mV) indicado en la parte inferior. Las letras representan el estado en que se encuentra el canal en cada zona del registro (C: Cerrado, O: Abierto, I: Inactivo).*

La inactivación es una característica que, como ya se ha comentado, presentan algunos canales de potasio y que determina durante cuánto tiempo éstos son capaces de conducir corriente desde que alcanzan el estado abierto tras la despolarización de la membrana. En función de sus características y de las estructuras implicadas se han descrito dos tipos básicos de inactivación: la inactivación tipo "N" y la inactivación tipo "C".

La inactivación tipo "N" se considera la más rápida y fue descrita por primera vez en el canal *Shaker* (Hoshi *et al*. 1990; Zagotta *et al*. 1990). Este tipo de inactivación sigue el modelo "bola y cadena", en que la cara interna del poro iónico es ocluida por la parte inicial del extremo amino, que tiene una estructura globular, conservada y cargada positivamente. Dicha estructura está unida al canal por medio de una "cadena" polipeptídica. Su densidad de carga permite su acercamiento al poro mediante atracción electrostática con los residuos negativos del lazo que une a los segmentos transmembranales S4 y S5 (Isacoff *et al*. 1991; Holmgren *et al*. 1996; Mannuzzu *et al*. 1996). La "cadena" no solo funcionaría como un mero espaciador, sino que tendría un papel importante en el control de la inactivación facilitando el posicionamiento de la "bola" con su lugar de interacción en el cuerpo central del canal (Hoshi *et al*. 1990). Además de la longitud de la "cadena", en algunos canales, la inactivación también está modulada por secuencias en el extremo amino que presentan motivos reguladores capaces de interferir en la interacción de la "bola" con el cuerpo central del canal (Roeper *et al*. 1998). Por otra parte, este tipo de inactivación también puede ser conferida por subunidades β reguladoras que aportan la "bola" a canales heteromultiméricos (Heinemann *et al*. 1994; Retting *et al*. 1994).

La inactivación tipo "C" suele ser una inactivación lenta y en la que no está implicado el extremo amino (de hecho esta inactivación es insensible a la deleción del mismo) sino que serían la región extracelular del poro y el segmento transmembranal S6 los implicados en este proceso (Hoshi *et al*. 1991; López-Barneo *et al*. 1993; Herzberg *et al*. 1998; Zou *et al*. 1998). Este tipo de inactivación se debe a una serie de cambios conformacionales que llevan al bloqueo del poro conductor por su cara externa o su colapso durante la despolarización.

El canal hERG presenta un caso peculiar de inactivación tipo "C" ya que se trata de una inactivación muy rápida que además, al contrario que las inactivaciones "N" y "C" clásicas, es dependiente de voltaje en todo el rango de activación. Por otra parte, la recuperación de la inactivación también es un proceso rápido al contrario de lo que ocurre en canales que presentan inactivación "C" clásica. Otra característica propia de la inactivación de hERG es que la recuperación se ralentiza al aumentar la concentración externa de K^+ (Rasmusson *et al*. 1998) y al contrario de lo que ocurre con otros canales como *Shaker*, también se puede ralentizar mediante la elevación de la concentración externa de Cs^+ (López-Barneo *et al*. 1993; Zhang *et al*. 2003).

Como ya se ha comentado, esta inactivación rápida y dependiente de voltaje que presenta hERG es fundamental para sus características de rectificador anómalo, causando junto a la lenta activación una reducción de la conductancia a voltajes positivos y permitiendo

un flujo transitorio de corriente al volver a voltajes negativos (Smith *et al*. 1996). Sin embargo, la lenta cinética de apertura y cierre también es imprescindible para dicho comportamiento anómalo, ya que aún en presencia de una inactivación y recuperación rápidas, si hERG también se abriese rápidamente podrían observarse niveles notables de corriente ante una despolarización. Por último debe resaltarse que el peculiar comportamiento cinético del canal es indispensable para su papel funcional en los procesos fisiológicos en los que interviene.

Respecto al proceso de apertura de hERG, las bases moleculares responsables de su lenta cinética aún no se han podido determinar con exactitud, siendo su conocimiento mucho menor que en otros canales como *Shaker*. Estudios de fluorimetría en condiciones de "clamp de voltaje" (Smith y Yellen 2002), así como medidas de las corrientes de compuerta (Piper *et al*. 2003), sugieren un movimiento lento de la hélice S4 en respuesta a la despolarización que podría estar implicado en la lenta cinética de apertura del canal. Este movimiento lento de la hélice S4 podría explicarse por la interacción electrostática entre los residuos positivos de la hélice S4 y otros componentes del sensor de voltaje (revisado en Cheng y Claydon 2012), así como por una posible interacción del segmento S4 con los lípidos de la membrana (Subbiah *et al*. 2004, 2005). Por otra parte, el propio lazo S4-S5 estaría implicado en la apertura al acoplar el dominio sensor de voltaje con el poro. Así, se ha visto que en canales *Shaker* la presencia de una repetición de leucinas es crítica para ese acoplamiento. Dicha repetición está interrumpida de forma natural en hERG por la presencia de la glicina 546, lo que podría contribuir a la lenta apertura propia de este canal, ya que la mutación de este residuo a leucina acelera la activación del mismo (Van Slyke *et al*. 2010).

3.1 El papel de los dominios citoplásmicos en la apertura y cierre de hERG.

Se ha demostrado que el extremo amino terminal juega un papel crítico en el lento proceso de cierre del canal hERG. Así, se comprobó que la eliminación casi completa del extremo amino (Δ2-373) causa un cierre del canal mucho más rápido, sin verse afectadas de forma notable las velocidades ni de apertura ni de inactivación (Schönherr y Heinemann 1996; Spector *et al*. 1996a; Wang *et al*. 1998). Experimentos adicionales demostraron que el efecto sobre el cierre causado por la deleción se debe de un modo más específico a la eliminación del dominio eag/PAS (residuos 1 a 135) (Morais-Cabral *et al*. 1998; Wang *et al*. 1998, 2000). De un modo más concreto, también se ha observado una cinética de cierre más rápida en canales con mutaciones puntuales localizadas en el dominio eag/PAS y que son causantes de síndrome QT largo tipo II (Chen *et al*. 1999). El hecho de que pequeñas deleciones en los primeros residuos del amino muestren un efecto comparable al de la deleción del dominio eag/PAS

completo apunta a que son dichos aminoácidos del extremo amino (1-26) los reguladores esenciales del cierre de hERG (Wang *et al*. 1998, 2000; Ng *et al*. 2011). En consecuencia, tanto el segmento inicial flexible como la hélice α que forman parte de los 26 primeros residuos se han propuesto como posibles determinantes de la lenta cinética de cierre del canal, aunque con diferentes interpretaciones de cómo contribuyen a ello. Por un lado, se ha propuesto un papel fundamental de la hélice α así como del PAS en la estabilización del estado abierto por su interacción con los dominios C-terminal, C-linker y cNBD (Muskett *et al*. 2011) o con el lazo S4-S5 en la zona central del canal (Li *et al*. 2010). Por otra parte, de un modo alternativo, también se ha sugerido que la hélice α más que por una interacción directa, actuaría como un mero espaciador entre la parte inicial del extremo amino y el PAS, estando unido a alguna parte del cuerpo central del canal haciendo que la región inicial desestructurada tenga un posicionamiento que permita su interacción con la maquinaria de cierre, ya fuese con el lazo S4-S5 (de la Peña *et* al. 2011; Ng *et al*. 2011) o con los dominios C-linker y cNBD (Al-Owais *et al*. 2009; Kolbe *et al*. 2010; Muskett *et al*. 2011). En nuestro laboratorio se ha demostrado la proximidad física entre el segmento inicial del extremo amino y el lazo S4-S5, ya que la colocación por mutagénesis dirigida de cisteínas tanto en uno como en el otro dominio, hace posible la formación de puentes disulfuro entre ellos, bloqueándose así los canales en un estado no conductor (de la Peña *et al*. 2011). Este fenómeno indicaría una proximidad compatible con un contacto físico entre ambos dominios. Por otra parte, se ha visto que la expresión en oocitos de *Xenopus* de un pequeño fragmento recombinante formado por el dominio eag de hERG unido a una proteína fluorescente, es capaz de recuperar la lenta velocidad de cierre en un canal que carece de prácticamente todo el extremo amino (Gustina *et al*. 2009; 2011).

Aún con todos estos datos, los mecanismos implicados en la modulación del cierre de hERG por el dominio eag no están del todo claros y se desconoce la contribución relativa de este dominio a los cambios conformacionales del canal que dan lugar al cierre del mismo. Si bien la reconstrucción funcional de canales con alteraciones estructurales por medio de fragmentos eag recombinantes parece una herramienta útil para entender como este dominio interactúa con otros dominios del canal afectando a su cinética de cierre, hasta ahora solo se había llevado a cabo la reconstrucción funcional en oocitos de *Xenopus* y en canales a los que se les había eliminado la mayor parte del extremo amino. Por ello, como se verá a continuación, uno de los objetivos de este trabajo ha sido estudiar esta reconstrucción funcional en células de mamífero y usando canales con alteraciones estructurales de menor magnitud, así como fragmentos recombinantes del dominio eag portando diversas

mutaciones, tratando de acotar la región de este dominio que interviene en el fenómeno de cierre. Además, si la interacción del dominio eag con el cuerpo central del canal tiene lugar a nivel del lazo S4-S5, mutaciones en esta región deberían ser capaces de impedir la unión del fragmento recombinante así como la reconstrucción funcional.

También se ha demostrado en nuestro laboratorio que el dominio proximal juega un papel crucial en la lenta cinética de apertura de hERG, así como en su modulación hormonal (Viloria *et al*. 2000; Gómez-Varela *et al*. 2002, 2003; Alonso-Ron *et al*. 2008, 2009). De este modo, si se deleciona solamente el dominio proximal (Δ136-373), no se ven afectadas ni la cinética de cierre ni la de inactivación, pero sí que se modifica la apertura, que se hace mucho más rápida y con una dependencia de voltaje desplazada hacia voltajes más negativos, haciendo que el canal abra ante despolarizaciones menos intensas. Por otro lado, una pequeña deleción de los aminoácidos 355 a 373 es suficiente para conseguir un efecto sobre la apertura de aproximadamente la mitad que el que se obtiene con la deleción completa (Viloria *et al*. 2000). También se ha identificado un pequeño grupo de residuos básicos cercanos al segmento S1 como determinantes de la cinética de apertura de hERG mediante interacciones electrostáticas (Saenen *et al*. 2006). No obstante, a diferencia de lo que ocurre ante la ausencia del dominio proximal, la respuesta hormonal permanece inalterada en ausencia de estos residuos básicos (Gómez-Varela *et al*. 2003; Alonso-Ron *et al*. 2009).

4. TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS EN EL CONOCIMIENTO DE LA ARQUITECTURA MOLECULAR DE LOS DOMINIOS CITOPLÁSMICOS DE hERG.

Como ya se ha indicado, el papel fisiológico que desempeña el canal hERG está íntimamente relacionado con sus características estructurales, así como con las posibles reorganizaciones funcionales asociadas a su actividad.

A lo largo de esta introducción se ha puesto de manifiesto la importancia de los largos dominios citoplásmicos amino y carboxilo terminales de hERG, tanto en su funcionalidad como en su regulación y que, a pesar de ello, son aún muy poco conocidas la estructura y las posibles reorganizaciones de estas grandes regiones citoplásmicas durante la actividad del canal. No obstante, recientemente se han podido observar ciertas modificaciones estructurales de los extremos citoplásmicos, asociadas a la activación y la inactivación de algunos canales de Ca^{2+} y K^{+} dependientes de voltaje mediante el empleo de métodos espectroscópicos de FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) (Kobrinsky *et al*. 2004,

2006, 2009). Es importante notar asimismo que, aún cuando las estructuras obtenidas por difracción de rayos X aportan una información esencial, al final resulta crucial situar ésta en un entorno funcional y dinámico *in vivo* que no puede darse en las condiciones no fisiológicas del material cristalizado. Así, medidas espectroscópicas en células vivas, determinando por FRET la separación relativa entre dos fluoróforos insertados en la proteína del canal o midiendo los cambios de FRET en los movimientos relativos de unos dominios proteicos frente a otros, pueden resultar de gran utilidad.

4.1. Transferencia de energía de fluorescencia por resonancia (FRET).

La técnica de FRET se basa en la transferencia de energía de fluorescencia desde un fluoróforo donador a uno aceptor mediante interacciones dipolo-dipolo. Cuando se irradia al donador con luz de una longitud de onda adecuada, se produce un dipolo oscilante que puede resonar con un dipolo en el aceptor siempre y cuando el espectro de excitación de este último se solape con el de emisión del donador, ambos se encuentren a una distancia inferior a 10 nm y la orientación sea la adecuada (Pollok y Heim 1999; Heyduk 2002). Esta interacción entre dipolos resonantes hace que se transfiera energía no radiante desde el donador hasta el aceptor. Si el aceptor es un fluoróforo, éste pasará a estado excitado y emitirá fluorescencia que podrá ser detectada (Figura 3). Este aumento en la fluorescencia del aceptor va acompañada de una disminución de la fluorescencia del donador, así como de una reducción de la vida media del estado excitado del donador que se manifiesta como una reducción de su tasa de fotoblanqueamiento (fotodestrucción). Por el contrario, la tasa de fotoblanqueamiento del aceptor aumenta. También se observa un incremento de la anisotropía (polarización) de la fluorescencia del donador (Subramaniam *et al*. 2003; Selvin 1995; Clegg 1992; Van Munster *et al*. 2005).

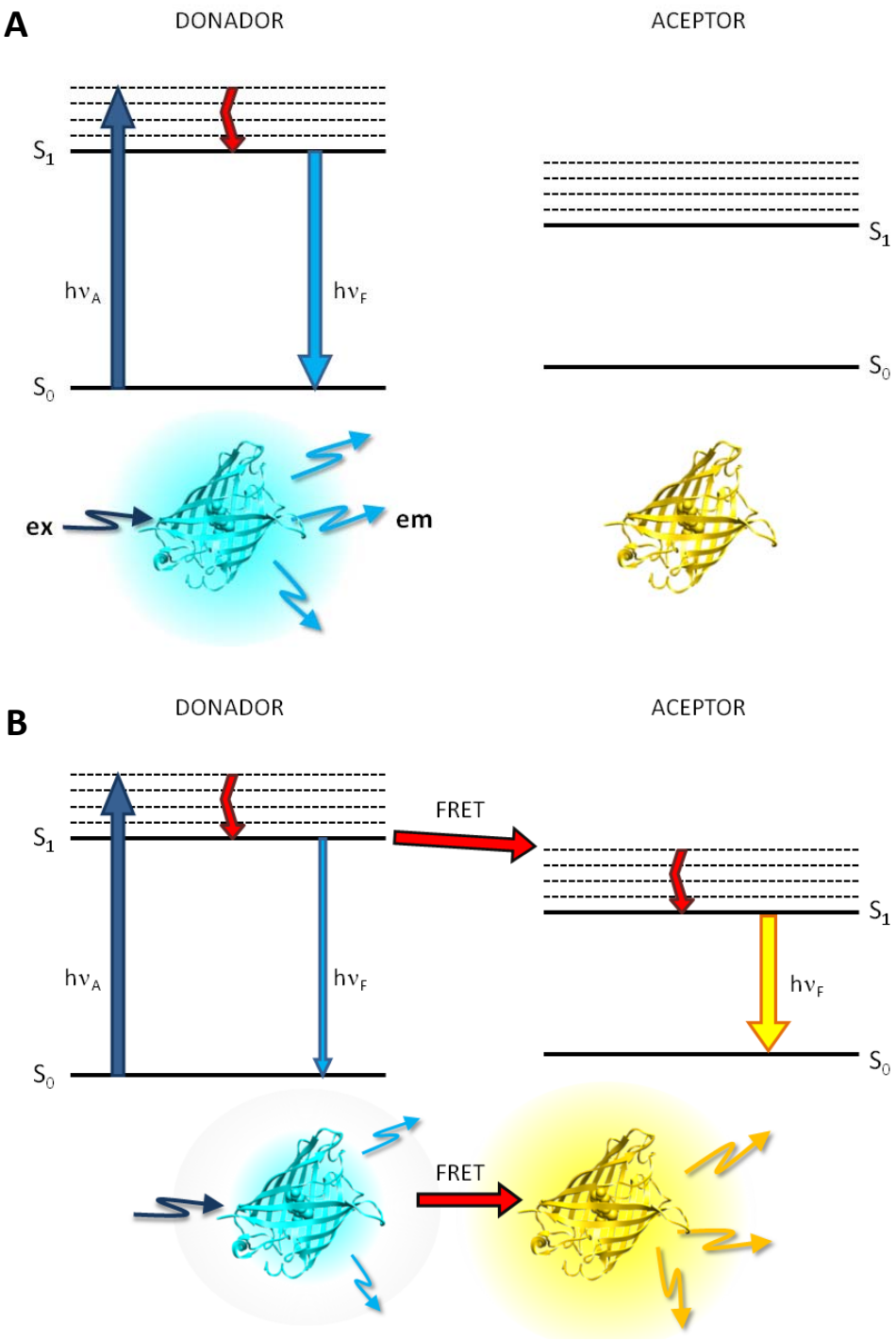


Figura 3. *Diagramas de Jablonski en los que se muestra la transición entre estados energéticos en ausencia (A) y presencia (B) de FRET. Los esquemas de los niveles energéticos corresponden al donador en la izquierda y al aceptor en la derecha. S_0 corresponde al nivel energético basal y S_1 al primer nivel energético excitado. Las líneas de puntos representan los estados de energía vibracional. Cuando el donador es irradiado con una longitud de onda adecuada ($h\nu_A$, flecha azul), se excitará pasando de S_0 a un nivel energético superior. Desde éste se pasará por relajación interna (flecha curva roja) a un nivel inferior (S_1). Cuando no se dan condiciones de FRET (A) la energía liberada para volver al estado basal será en forma de fluorescencia ($h\nu_F$, flechas curvas azules). Cuando ambos fluoróforos presentan un solapamiento de espectros adecuado y se encuentren a una distancia y en una orientación adecuadas (B), parte de la energía liberada para volver al estado basal, será transferida al aceptor, haciéndole pasar a un nivel energético superior. Finalmente el aceptor volverá a su nivel energético basal por relajación interna y liberando energía en forma de fluorescencia ($h\nu_F$, flechas amarillas curvas).*

La detección y cuantificación de FRET se puede realizar de dos formas basándose en la medida de la intensidad de la fluorescencia, ya sea detectando un incremento en la emisión de fluorescencia del aceptor o una disminución en la del donador, o mediante el análisis de la cinética de caída de la fluorescencia, que determina la disminución de la vida media del estado excitado del donador (Day y Schaufele 2005; Kenworthy 2001). A su vez, dentro de cada una de estas aproximaciones existen diferentes métodos de cuantificación de FRET en función de qué fluoróforos o parámetros se estudien, pudiéndose medir el incremento de fluorescencia del aceptor debido al FRET, la disminución de fluorescencia del donador, o el incremento de fluorescencia del donador al blanquear al aceptor.

La eficiencia de esta transferencia de energía del fluoróforo donador al aceptor depende de la distancia entre ambos fluoróforos así como de su orientación, siendo casi nula a distancias superiores a 10 nm. Esta eficiencia de FRET (E_{FRET}) se define como la fracción de moléculas del donador que liberan su energía de excitación por transferencia al aceptor. La relación entre la la eficiencia de FRET y la distancia entre fluoróforos viene dada por la siguiente fórmula:

$$E_{FRET} = \frac{{R_0}^6}{{R_0}^6 + d}$$

Donde E_{FRET} es la eficiencia de FRET, *d* la distancia entre donador y aceptor y R_0 (distancia de Förster) es la distancia a la cual la eficiencia de FRET es la mitad de la máxima. Esta R_0 suele moverse en el rango de nanómetros y depende del grado de solapamiento de los espectros de emisión del donador y excitación del aceptor, así como de la orientación relativa de ambos fluoróforos, la polaridad del medio y el rendimiento cuántico del donador según la siguiente expresión:

$$R_0 = 0.021\sqrt[6]{J\Phi_D n^{-4}\omega^2}, (\mathrm{nm})$$

Donde *J* es el solapamiento de la emisión del donador con la absorbancia del aceptor, Φ_D es el rendimiento cuántico del donador y *n* es el índice de refracción del medio (que es proporcional a la polaridad del medio y que determina la intensidad del campo eléctrico). Finalmente, ω es el factor de orientación del par aceptor-donador, para el cual se suele adoptar un valor de 2/3 asumiendo una orientación al azar de los momentos de los dipolos, si bien para asumir esto es necesario que el moviento espacial sea menor que la vida media del fluoróforo.

4.2. Uso de proteínas fluorescentes como fluoróforos biológicos.

Para el estudio de FRET puede recurrirse al empleo de fluoróforos químicos o biológicos. Por ello es común el uso de proteínas fluorescentes derivadas de la proteína fluorescente verde (GFP), ya que al ser sintetizadas *in vivo* simultáneamente con las proteínas a las que van fusionadas presentarán unos patrones de expresión y distribución que se asemejarán más a los patrones nativos de localización de las proteínas a las que van fusionadas. Sin embargo, también presentan la desventaja de ser fluoróforos muy voluminosos, pudiendo dificultar o alterar la interpretación cuantitativa de las distancias calculadas por FRET.

La GFP, aislada del órgano emisor de luz de la medusa *Aequorea victoria* (Shinomura *et al*. 1962), consta de 238 aminoácidos distribuidos en 11 hojas β que adoptan una forma de un barril con una hélice coaxial situada en su interior, estando los extremos amino y carboxilo paralelos y cercanos entre sí (Ormo *et al*. 1996). El cromóforo de la GFP se encuentra en la hélice del interior de la estructura en barril y para su función como tal no necesita de la participación de otros productos génicos ni cofactores, siendo suficiente una reacción autocatalítica en la que existe una ciclación y una oxidación de los residuos serina-dehidroxitirosina-glicina (aminoácidos 65-67) (Cody *et al*. 1993). La GFP puede ser expresada manteniendo su funcionalidad en un gran número de organismos (Prasher *et al*. 1992; Chalfie *et al*. 1994; Wang y Hazelrigg 1994; Niedenthal *et al*. 1996). Estas características la han convertido en una herramienta muy popular para crear proteínas de fusión fluorescentes, permitiendo una fácil detección y seguimiento en sistemas vivos (Wang y Hazelrigg 1994; Marshall *et al*. 1995). Otra característica de la GFP de particular interés y utilidad, es que mediante mutagénesis dirigida se han podido generar variantes más estables y brillantes y sobre todo con diferentes espectros tanto de excitación como de emisión, como son las proteínas fluorescentes azul (BFP), cian (CFP), amarilla (YFP y Venus) (revisado en Yuste 2005 y Chudakov *et al*. 2005). La generación de estas variantes fluorescentes ha favorecido la aparición de nuevas aproximaciones experimentales como experimentos de co-localización de diferentes proteínas diana o estudios de interacciones proteína-proteína mediante FRET (Ellenberg *et al*. 1999; Miyawaki y Tsien 2000; Miyawaki *et al*. 2003).

La pareja de variantes de GFP que más se utilza hoy día en experimentos de FRET es la compuesta por CFP e YFP, que funcionarán el primero como donador (CFP, con máximos de excitación y emisión a 437 y 474 nm respectivamente) y el segundo como aceptor (YFP, con máximo de excitación a 514 nm y de emisión a 527nm; Heim *et al*. 1994; Ellenberg *et al*. 1999).

4.3 Uso de FRET en la medida de distancias intra e intermoleculares.

Si bien el uso más común de las técnicas de FRET es la detección de interacciones a nivel cualitativo o el seguimiento de cambios conformacionales, el FRET también se puede emplear para la medida de distancias intra e intermoleculares gracias a su sensibilidad a los cambios de distancia entre cromóforos al depender la señal de FRET de la sexta potencia de la distancia. Así, cuanto más lejos se encuentren donador y aceptor, menor será la transferencia energética. Por ello, la realización de un análisis cuantitativo de la señal de FRET con un par de fluoróforos situados en posiciones concretas de una molécula proteica, aporta una oportunidad única para conocer la distancia entre donador y aceptor en el entorno celular bajo condiciones fisiológicas (Stryer 1978; Selvin 1995).

El rango de distancias que se pueden medir mediante FRET depende del valor de R_0 de la pareja de fluoróforos empleados. Habitualmente las distancias medibles se sitúan entre 1 y 12 nm, distancia que abarca suficientemente el grosor de una membrana biológica o el ancho de muchas biomoléculas . Por esta razón se ha llegado a emplear el FRET como una posible "regla molecular", siendo posible medir distancias entre cromóforos presentes o introducidos en ciertas macromoléculas (Stryer y Haugland 1967; Dos Remedios y Moens 1995; Elangovan *et al*. 2003; Daelmans *et al*. 2004; Gustiananda *et al*. 2004; Chen *et al*. 2006; Lakowicz 2006).

Para la realización de estudios de FRET es necesario comenzar con la generación de las proteínas de fusión con los fluoróforos adecuados. En nuestro laboratorio se ha venido utilizando la pareja CFP/YFP, que como ya se ha comentado es habitual en estudios de FRET. Si bien el modo convencional y simple de etiquetado con estos fluoróforos es fusionarlos a los extremos amino y/o carboxilo de la proteína huésped, frecuentemente estos no son los sitios idóneos de inserción. Una alternativa es situar estos fluoróforos en sitios internos de la proteína. Sin embargo la elección de los sitios adecuados y permisivos es difícil y además puede ser un proceso muy laborioso. Por ello, en nuestro laboratorio se optó por insertar estas proteínas fluorescentes en distintos puntos aleatorios de hERG, para lo cual se utilizó el comportamiento al azar de transposones recombinantes e hiperactivos, que portan las regiones codificantes de las proteínas fluorescentes cian (CFP) o amarilla venus (VFP, una variante mejorada de la YFP), por medio de reacciones de transposición *in vitro* (Giraldez *et al.* 2005; Sheridan *et al*. 2002). Mediante el empleo de este método se generaron dos colecciones de proteínas de fusión fluorescentes del canal hERG: 40 recombinantes con inserciones diferentes para VFP y 37 recombinantes fusionados a CFP (D. García Manso, Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo, 2006; Miranda *et al*. 2008). De ellos, 25 corresponden a inserciones en el extremo amino, 33 en la región carboxilo terminal y 19 en el cuerpo central del canal. Por

otro lado, dado que es posible intercambiar entre sí las proteínas fluorescentes, realmente se dispone de 77 sitios potenciales de inserción para estos dos fluoróforos a lo largo de la proteína de hERG. Además de éstos, también se generaron canales etiquetados en los extremos amino y carboxilo, así como canales doblemente etiquetados en los dos extremos con ambos fluoróforos, que son importantes tanto para asegurar una estequiometria fija entre los fluoróforos, como para poder confirmar las distancias intramoleculares estimadas a partir de las medidas de FRET. Por último, debe indicarse que la caracterización electrofisiológica de gran parte de la colección de canales fluorescentes ha confirmado la funcionalidad de una fracción sustancial de los mismos.

De este modo, realizando medidas de FRET con algunos de estos canales fluorescentes y funcionales, se determinaron las distancias y el posicionamiento relativo de los fluoróforos introducidos en los extremos amino y carboxilo del canal, así como en los resiuos 345 y 905 de las regiones amino y carboxilo terminales. Con los datos obtenidos a partir de estas medidas se generó un modelo inicial de la posible arquitectura molecular de los dominios citoplásmicos del canal, según el cual el residuo 345 así como el extremo amino terminal estarían más cerca del cuerpo central del canal en la membrana, mientras que el carboxilo terminal de la proteína estaría más alejado de éste (Miranda *et al*. 2008).

Sin embargo, pese al interés objetivo de estos resultados, la consecución de este trabajo planteó dos cuestiones. Por un lado al haber llevado a cabo los estudios de FRET mediante epifluorescencia, la señal fluorescente procede de toda la célula y no solo de los tetrámeros del canal que estén correctamente ensamblados en la membrana plasmática, de modo que subunidades aún no ensambladas, en tránsito o mal ensambladas, podrían estar contribuyendo a los niveles de FRET. Por otra parte, si bien la explicación más coherente acerca del posicionamiento de los dominios citoplásmicos respecto a la membrana plasmática podría ser la que se ha indicado, los datos obtenidos permitieron estimar las distancias relativas entre los fluoróforos introducidos en las posiciones 1, 345, 905 y 1158, pero su orientación respecto a la membrana no fue determinada de forma directa. Por ello, dichos datos serían igualmente compatibles con un posicionamiento inverso de dichas estructuras, es decir, con el extremo carboxilo terminal más cerca del cuerpo central del canal y el amino más alejado.

4.5 Fluorescencia por reflexión total interna (TIRF) y su combinación con FRET.

Una posible aproximación para evitar registrar en los experimentos de FRET fluorescencia de tetrámeros del canal que aún no se han ensamblado o lo han hecho un modo incorrecto y se encuentran en otras membranas internas de la célula, es el empleo de iluminación en condiciones de TIRF, que permite iluminar selectivamente la zona de la célula que se encuentra en contacto con el cubreojetos y corresponderá en gran parte a la membrana plasmática de la misma.

El TIRF se basa en el uso de un láser que se hace incidir sobre las células cultivadas en la superficie de un cubreojetos de vidrio en un ángulo (llamado ángulo crítico), de modo que al llegar a la interfase vidrio-agua y debido al diferente índice de refracción del medio acuoso, el láser es reflejado de vuelta al interior del vidrio. Esta reflexión total interna del láser genera un campo electromagnético en el líquido que tiene la misma frecuencia que la luz incidente. Este campo magnético, también denominado onda evanescente, decae exponencialmente según se aleja de la superficie. Esto permite excitar selectivamente a los fluoróforos localizados cerca de la superficie (aproximadamente hasta los 200 nm) mientras que otros fluoróforos más alejados permanecerán no excitados (Axelrod 2003; ver también Figura 4). De este modo, se obtienen imágenes con muy poca fluorescencia de fondo, prácticamente nada de fluorescencia desenfocada y una exposición mínima de las células a la luz en otros planos focales.

Si bien las aplicaciones biológicas de la iluminación con TIRF son numerosas, desde visualización selectiva de zonas de contacto de la célula con el sustrato hasta el seguimiento de gránulos de secreción, en este trabajo se buscó su uso como alternativa a la iluminación por epifluorescencia en los experimentos de FRET tal como se ha aplicado recientemente en trabajos con otros canales iónicos (Fisher *et al*. 2004; Riven *et al*. 2006; Fowler *et al*. 2007; Bal *et al*. 2008), permitiendo una mejor interpretación de los niveles de FRET procedentes solamente de los tetrámeros ensamblados presentes en la membrana plasmática.

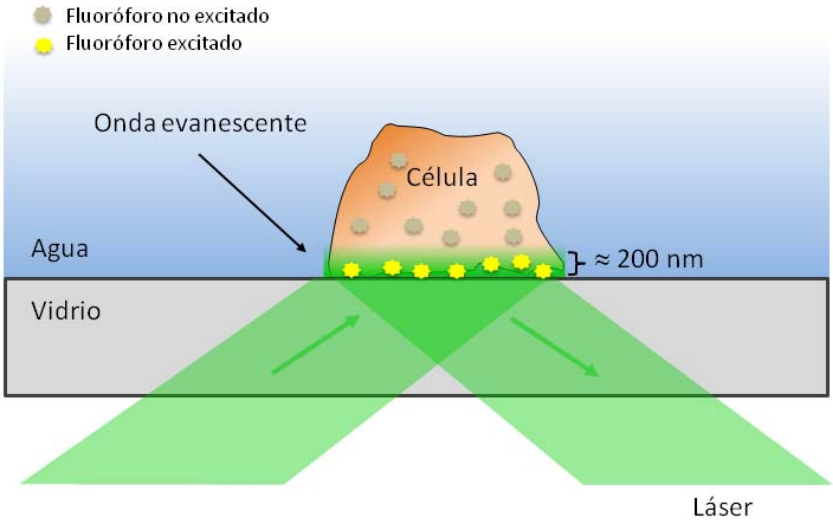


Figura 4. *Base conceptual del TIRF. Se representa esquemáticamente la llegada a través del objetivo del haz de luz procedente del láser en el denominado "angulo crítico" y la subsiguiente reflexión total de la luz de vuelta al interior del cubreobjetos, con la generación de la onda evanescente y la excitación selectiva de los fluoróforos localizados en la estrecha capa de contacto con la superficie del vidrio.*

De acuerdo con todos estos antecedentes, en el presente trabajo hemos intentado responder a las siguientes cuestiones generales: Por una parte hemos tratado de responder a los dos interrogantes principales que presentaba el modelo de posicionamiento de los dominios citoplásmicos generado previamente (Miranda *et al*. 2008). Es decir, nos propusimos estudiar si el hecho de realizar los experimentos de FRET bajo condiciones de epifluorescencia afecta negativamente a la medición de las distancias relativas entre distintos residuos del canal hERG. Para ello nos planteamos llevar a cabo experimentos similares esta vez bajo condiciones de TIRF restringiendo así la señal detectada a los fluoróforos localizados cerca de la membrana plasmática. Para tratar de dilucidar la orientación de los dominios citoplásmicos respecto a la membrana plasmática, nuestra propuesta ha consistido en estudiar por FRET las distancias relativas de distintos residuos etiquetados de hERG respecto a un punto fijo, la membrana plasmática, aprovechando para ello la capacidad de ciertos colorantes que se insertan en la membrana plasmática para atenuar por FRET la fluorescencia de las proteínas fluorescentes fusionadas al canal. Por otro lado, nos hemos propuesto estudiar la interacción del dominio eag con otras estructuras de hERG, que conlleva la modulación de su cinética de cierre. Para ello, hemos utilizado un fragmento recombinante que contiene el dominio eag para restaurar la cinética de cierre normal en canales que presentan diferentes alteraciones estructurales, así como diversas mutaciones, tanto en el canal como en el propio fragmento recombinante.

OBJETIVOS

Los dominios citoplásmicos en los canales iónicos en general y del canal hERG en particular tienen gran importancia en el funcionamiento y la modulación fisiopatológica de estas entidades. El objetivo general esta Tesis es profundizar en el conocimiento de dichos dominios, particularmente del dominio eag, tanto a nivel de su arquitectura molecular como de la relevancia funcional de su interacción con la maquinaria de apertura y cierre a nivel del lazo S4-S5. Para ello, nos hemos propuesto los siguientes objetivos concretos:

1- Implementar un sistema de TIRF y combinarlo con la tecnología de FRET para medir distancias intramoleculares con canales hERG etiquetados con proteínas fluorescentes, ciñendo las determinaciones solamente a los canales presentes en la membrana plasmática.

2- Determinar la posición y orientación relativas de los dominios intracelulares de hERG respecto a la membrana plasmática como punto de referencia, mediante la medida de las distancias entre fluoróforos introducidos en diferentes posiciones de hERG y un colorante ($DiBAC_4(5)$ o DPA) que se inserta en la membrana y se trasloca a través de las dos monocapas de la misma de forma dependiente de voltaje.

3- Estudiar los determinantes moleculares de la interacción entre el dominio *eag* y el cuerpo central del canal hERG a nivel del lazo S4-S5, mediante experimentos tanto de reconstrucción funcional como de TIRF/FRET entre canales portando mutaciones y deleciones y fragmentos recombinantes con secuencias del extremo amino de hERG.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. PLÁSMIDOS RECOMBINANTES.

pcDNA3B hERG. Contiene la secuencia codificante de hERG entre los sitios de restricción *Hind*III y *BamH*I del plásmido pcDNA3B (el cual está modificado a partir de pcDNA3 eliminando mediante mutagénesis el sitio de restricción *Bgl*II; P. de la Peña, Univ. Oviedo). Este vector plásmídico contiene los sitios de reconocimiento para las RNA polimerasas T7 y SP6, el promotor de CMV, el origen de replicación de SV40 y los genes de resistencia a Ampicilina y Neomicina. El plásmido recombinante pcDNA3B hERG se utiliza rutinariamente para la expresión funcional del canal en células de mamífero mediante transfección transitoria, y es el plásmido base que alberga las fusiones fluorescentes de hERG con las proteínas eYFP y eCFP (ver más adelante).

pSP64A+ hERG. (Cedido originalmente por el Dr. Enzo Wanke (Universidad de Milán)). Contiene la secuencia codificante de hERG entre los sitios de restricción *HindIII* y *BamHI*. El vector plásmídico contiene el gen de resistencia a Ampicilina y presenta un sitio de reconocimiento para la RNA polimerasa SP6 y una cola de poli A+.

Los plásmidos recombinantes que portan las secuencias codificantes de las proteínas de fusión fluorescentes YFP y/o CFP empleadas en este trabajo fueron las siguientes:

pYFP-TRHR. Obtenido por clonación del cDNA del receptor de TRH adenohipofisario (de la Peña *et al*. 1992) en los sitios *Hind*III y *Bam*HI del vector pEYFP-N1 (Clontech) y que contiene la secuencia codificante para la eYFP en pauta de lectura tras el extremo carboxilo del receptor de TRH como fusión C-terminal De un modo análogo se generó la construcción pCFP-TRHR a partir del vector pECFP-N1.

pYFP-hERG y **pCFP-hERG**. Generados por clonación del cDNA del canal hERG entre los sitios *Hind*III y *Bam*HI de los vectores pEYFP-C1 y pECFP-C1 (Clontech) y que contienen las secuencias codificantes de las variantes amarilla (eYFP) o cian (eCFP) mejoradas de la GFP respectivamente. Las secuencias codificantes de las proteínas fluorescentes se sitúan en este caso en pauta de lectura delante del extremo amino del canal como fusiones N-terminales (Manso, 2006. Tesis Doctoral, Univ. Oviedo; Miranda *et al*. 2008). A lo largo de esta memoria también nos referiremos a estas construcciones como YFP1-hERG y CFP1-hERG.

Canales hERG doblemente etiquetados con ambos fluoróforos **pYFP1-hERG-CFP1158**, **pCFP1-hERG-VFP905** y **pCFP345-hERG-VFP1158**. Fueron generados mediante la combinación de fragmentos de restricción conteniendo las proteínas fluorescentes insertadas en hERG y

provenientes de construcciones fluorescentes que contenían cada uno de los dos fluoróforos (Miranda, 2008. Tesis Doctoral. Univ. Oviedo; Miranda *et al*. 2008).

Construcciones fluorescentes de hERG con diferentes inserciones internas **pCDNA3B - VFP144-hERG**, **VFP213-hERG**, **VFP345-hERG, VFP905-hERG**, **VFP1040-hERG** y **VFP1158-hERG**. Obtenidas mediante reacciones de transposición *in vitro* utilizando un transposón recombinante que portaba la secuencia de la proteína fluorescente venus (VFP, una variante mejorada de YFP). Los número tras VFP indican el residuo aminoacídico del canal hERG tras el cual quedó insertada la proteína fluorescente (Manso, 2006. Tesis Doctoral, Univ. Oviedo; Miranda *et al*. 2008). Todas estas fusiones fluorescentes fueron subclonadas como derivados del plásmido recombinante base pcDNA3B-hERG. De un modo análogo se generó la construcción **pcDNA3B-hERG-CFP1158**.

La construcción usada como control de expresión en superficie **Rho-pYC** (generosamente donada por la Dra. T. Giráldez, Univ. La Laguna) contiene las secuencias de las proteínas fluorescentes eYFP y eCFP en tándem separadas por un péptido de 13 residuos (VTAARSGPGTQIS) y portando en el carboxilo terminal de la CFP la secuencia de prenilación de Rho (RQKKRRGCLLL) para su anclaje a la membrana plasmática.

El plásmiso **pEGFP-F** (Clontech) porta la proteína fluorescente verde con una señal de farnesilación para su localización en la membrana plasmática y fue donada por el grupo del Dr. P.S. Lazo (Univ. Oviedo).

2. GENERACIÓN DE DISTINTAS CONSTRUCCIONES DEL CANAL hERG PORTANDO MUTACIONES Y DELECIONES.

pcDNA3B-hERG-V3C, Y542C y G546C. Los canales hERG con las mutaciones puntuales V3C, Y542C y G546C se generaron por mutagénesis dirigida mediante PCR tal como ya se ha descrito previamente (Alonso-Ron, C. Tesis Doctoral, Univ. Oviedo). Los mutantes con etiqueta fluorescente se generaron sustituyendo el fragmento *Hind*III/*BstE*II o *BstE*II/*Blg*II del canal entero fluorescente (pcDNA3B-hERG-CFP1158) por el fragmento correspondiente del canal mutado. Para la construcción pcDNA3B-hERGV3C se sustituyó el fragmento *Hind*III/*Bam*HI en pcDNA3B-hERG.

pSP64-hERG-K28E y R56Q. Los mutantes K28E y R56Q se generaron con una estrategia de mutagénesis por PCR similar a los anteriores (Ho *et al*. 1989, ver apartado 7). Para los fragmentos 5´se usó como molde un dímero del canal nativo y como oligonucleótido (externo)

con sentido 5´-CGGGATCCCTTCTGGGGTGACAGTCGGGGCCGCCAGTACC-3´ que hibrida en el residuo 1000. Como antisentido el oligo interno 5´-GAGGGCCAGAGCCGTGAGTTCATCAT CGCCACC-3´para la mutación K28E y 5´-CTGTGCGGCTACTCGCAGGCCGAGGTGATGCAGCG-3´para introducir R56Q. Para los fragmentos 3´se usó como molde hERG nativo y como oligos internos sentido 5´-GTTGGCGATGATGAACTCACGGCTCTGGCCCTC-3´ para K28E y 5´-CT GTGCGGCTACTCGCAGGCCGAGGTGATGCAGCG-3´para R56Q. Como cebador externo antisentido el oligo 5´-GGGCCCGAGCCCTGCCACGTGGTTGTCCATGGC que hibrida a la altura del residuo 217. En la tercera PCR se usaron el oligo sentido 5´-GGAAGCTTTCAGG**ATG**CC GGTGCGGAGGGGCCAC-3´ (que introduce un sitio HindIII antes del codón de inicio) y como antisentido 5´-TTCAGGCGGAAGGTCTTGGCGCGGCCTGGGGCCAGCC-3´, que introduce un sitio *BstXI* tras el residuo 156 . El producto final fue digerido con *HindIII* y *BstXI* y subclonado en el vector pGEM-T, a partir del cual se subclonó por sustitución en pSP64-hERG.

pcDNA3B-hERG-C1158 Δ2-135 y Δ2-370. La estrategia seguida para generar las deleciones amino terminales Δ2-135 y Δ2-370 también han sido descrita previamente (Viloria *et al*. 2000, Alonso-Ron *et al*., 2008). El etiquetado con CFP en el extremo carboxilo se realizó sustituyendo el fragmento *Hind*III/*Bgl*II de los mutantes delecionados en pcDNA3B-hERG-C1158.

3. GENERACIÓN DE CONSTRUCCIONES QUE CONTIENEN FRAGMENTOS RECOMBINANTES DEL DOMINIO EAG.

pYFP-1-135-hERG. Para obtener las construcciones portadoras del dominio eag etiquetado con YFP en su extremo carboxilo, en primer lugar se generó mediante PCR un fragmento conteniendo los residuos 1-135 flanqueados por los sitios de restricción *HindIII* y *BamHI*, utilizando como molde el plásmido pSP64A+ hERG y como cebadores un oligonucleótido sentido que contiene la secuencia del sitio *HindIII* y el comienzo de la secuencia del canal (5´-GGAAGCTTTCAGG**ATG**CCGGTGCGGAGGGGCCAC-3´) y un oligonucleótido antisentido que contiene los últimos residuos del dominio eag (hasta el 135) seguido por un sitio *BamHI* (5´-CGGGATCCTTCTCCATCACCACCTCGAAATTG-3´). El fragmento resultante fue digerido con *HindIII* y *BamHI* y subclonado en el vector pEYFP-N1 (Clontech), en pauta con YFP quedando fusionada al extremo c-terminal del fragmento.

pYFP-1-135-hERG-V3C, R4C, G6C y V8C. Para la generación de los fragmentos recombinantes conteniendo las mutaciones V3C, R4C, G6C y V8C se siguió el mismo procedimiento, utilizando en cada caso un cebador sentido conteniendo la mutación correspondiente.

pYFP-1-135-hERG-K28E y R56Q. Los fragmentos recombinantes del dominio eag conteniendo las mutaciones **K28E** o **R56Q** se obtuvieron del mismo modo usando en este caso como moldes psp64A + hERGK28E ó psp64A + hERGR56Q, respectivamente.

pIRES-1-135. Para la construcción del plásmido que codifica un RNA bicistrónico que contiene el dominio eag (1-135) y una molécula de GFP en primer lugar se generó por PCR el fragmento conteniendo los residuos 1 a 135 de hERG siguiendo una estrategia igual a la descrita para pYFP-1-135, pero utilizando como oligonucleótido sentido 5´-CGGAATTCAG G**ATG**CCGGTGCGGAGGGGC-3´ para introducir el sitio de restricción *EcoRI* previo al codón de inicio y como oligonucleótido antisentido 5´-GGGGATC**CTA**CTTCTCCATCACCACCTCGAAA-3´ que contiene un codón de parada tras el residuo 135 seguido por un sitio *BamHI*. El fragmento fue digerido con *EcoRI* y *BamHI* y subclonado en el vector pIRES2-EGFP (Clontech), que contiene la secuencia IRES (sitio interno de entrada del ribosoma) del virus de la encefalomiocarditis entre el sitio múltiple de clonación y una región codificante de EGFP, lo que permite que tanto la secuencia introducida como la GFP sean traducidas a partir de un único mRNA bicistrónico.

pIRES-1-15. Para insertar el pequeño fragmento 1-15 en el vector pIRES2-EGFP se generó un fragmento desde el promotor CMV hasta el inicio de la GFP conteniendo la secuencia del fragmento 1-15 en el sitio múltiple de clonación. Para ello en primer lugar se generaron dos fragmentos solapantes por la secuencia 1-15: un fragmento 5´desde el CMV hasta el inicio del sitio múltiple de clonación seguido de la secuencia 1-15, y un fragmento 3´desde la secuencia 1-15 seguida por la continuación del sitio múltiple de clonación hasta el inicio de la GFP. El fragmento 5´se obtuvo por PCR usando como molde al propio vector y como cebadores un oligo externo sentido que hibrida en el CMV (5´- TAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTC ATAGCCC-3´) y un oligo interno antisentido que contiene la parte del sitio múltiple de clonación y la secuencia 1-15 (5´-CTACAGGAAGGTGTTCTGCGGCGCGACGTGGCCCCTCCGC ACCGGCATCCTTAAAGCTTGAGCTCGAGATCTGAGTCCGGTAGCG-3´). Por su parte, para el fragmento 3´, como cebador sentido se usó un oligo interno que contiene desde la secuencia 1-15 hasta la secuencia IRES (5´-CGGTGCGGAGGGGCCACGTCGCGCCGCAGAACACCTTCCT GTAGCCCGGGATCCGCCCCTCTCCCTCCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCC-3´) y como oligonucleótido externo antisentido uno que contiene el inicio de la GFP (5´-GGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGCT CACCATGGTTGTGG-3´). En la 3º PCR los fragmentos fueron amplificados utilizando para ello los oligos externos usados en el primer paso (el oligo que parte del CMV como sentido y el que contiene el incio de la GFP como antisentido). Este último fragmento fue digerido con *NdeI* y

BstXI, subclonado en pGEM-T y finalmente usado para sustituir el fragmento correspondiente *NdeI-BstXI* del vector pIRES2-EGFP.

4. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE *E.COLI* Y PURIFICACIÓN DEL DNA PLASMÍDICO.

La propagación de los plásmidos recombinantes se llevó a cabo en *E.coli* XL1-Blue. El cultivo de las bacterias se llevó a cabo en medio LB (Luria-Bertani) modificado, cuya composición es: triptona 20 g/L, extracto de levadura 10 g/L y NaCl 10 g/L. (pH ajustado a 7.5 con NaOH). El medio se esterilizó en autoclave durante 20 min a 120ºC. Para los cultivos en medio sólido, al medio anterior se añadió agar a una concentración final de 15 g/L.

Las células competentes se prepararon según el método descrito por Inoue *et al*. (1990) y se mantuvieron congeladas a -70ºC hasta su uso. Para llevar a cabo la transformación, el DNA plasmídico se mezcló con las células competentes y la mezcla se mantuvo en hielo durante 30 min. Después las células se sometieron a un choque térmico a 42ºC durante 45 s, se retornaron brevemente al hielo, se añadieron 500 µL de medio LB y se incubaron a 37ºC durante 60 min. Finalmente la mezcla se extendió en placas de LB-agar con 100 mg/L de ampicilina o 50 mg/L kanamicina para seleccionar los transformantes.

Las colonias seleccionadas se picaron con un palillo y se sembraron en 3 mL de medio LB líquido con ampicilina o kanamicina, cultivándose a 37ºC en agitación durante aproximadamente 18 h. El DNA plasmídico se obtuvo de las bacterias transformadas mediante el empleo del kit "QIAprep Spin MiniPrep" (Qiagen) siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial.

5. CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES Y TRANSFECCIÓN TRANSITORIA.

Las células HEK293 y CHO fueron cultivadas en una atmósfera saturada de humedad en un incubador a 37ºC y 5% CO_2. El medio de cultivo utilizado fue DMEM F12 (Lonza) complementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, 50 U/mL de penicilina y 50 µg/mL de estreptomicina.

24 h antes de ser transfectadas, las células HEK293 o CHO se sembraron en placas Petri de 35 mm de diámetro conteniendo cubreobjetos de 10 mm de diámetro cubiertos de polilisina, o en placas "Fluoro-dish" (35 mm de diámetro) con fondo de vidrio también cubierto con polilisina (WPI). Los plásmidos recombinantes se transfectaron usando como vehículo de

transfección Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Para ello, se diluyeron por separado entre 1 y 3 µg de DNA total y una cantidad equivalente de lipofectamina en un pequeño volumen (150 µl) de medio DMEM F12 sin suero ni antibióticos. A los 5 min se mezclaron y se incubó la mezcla 20 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, la mezcla se añadió a la placa con las células a la que previamente se le había quitado el medio y se añadieron 700 µl de DMEM con 10% de suero fetal bovino pero sin antibióticos. A partir de las 6 h de transfección, el medio fue sustituido por medio de cultivo completo, incluyendo suero y antibióticos. Los experimentos con las células transfectadas se llevaron a cabo 24-48 h después de la transfección.

6. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

Las reacciones de amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevaron a cabo utilizando 2-5 ng de DNA molde y 10 pmol de cada oligonucleótido sentido y antisentido. El resto de los reactivos necesarios para completar la reacción se añadieron mediante el preparado comercial "ReadyMix™ REDTaq™ PCR Reaction Mix with $MgCl_2$" de modo que la reacción final contenía 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.001% de gelatina, 0.2 mM de mezcla de nucleótidos trifosfato dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) y 30 U/ml de DNA Polimerasa Taq.

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Eppendorf Mastercycler Personal. Las muestras se sometieron a una primera fase de desnaturalización (98ºC, 1 min), hibridación (2 min a la temperatura de hibridación) y extensión (72ºC, 2 min) hasta completar un total de 35 ciclos. Finalmente se efectuó un ciclo de extensión adicional a 72ºC durante 5 min.

La temperatura de hibridación (T_h) para cada nucleótido se calculó a partir de la ecuación:

$$T_h = 70 + 41[G + C/L] - 675/L$$

en la que los valores G y C corresponden al número de guaninas y citosinas, respectivamente, que contiene el oligonucleótido y L al número total de nucleótidos del mismo.

7. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA MEDIANTE PCR.

La mutagénesis dirigida se llevó a cabo por el método descrito por Ho *et al.* (1989) y permite la generación de variantes con mutaciones puntuales o con pequeñas inserciones. La generación de mutantes consta de tres etapas sucesivas, que se corresponden con tres

reacciones de PCR. Este tipo de mutagénesis requiere el empleo de cuatro oligonuclétidos. Dos de ellos (sentido y antisentido), que son llamados oligonucleótidos internos, contienen la mutación a introducir y han de hibridar con las dos hebras de DNA molde en la posición donde se desea introducir la mutación. Los otros dos oligonucleótidos (sentido y antisentido), llamados externos, han de hibridar en posiciones alejadas y más o menos equidistantes a la mutación. Además, estos oligonucleótidos externos deben hibridar en zonas cercanas a sitios de restricción de interés en el DNA molde.

En la primera etapa se amplifican dos fragmentos de DNA mediante dos reacciones de PCR independientes utilizado en cada caso uno de los oligonucleótidos externos y uno de los internos. Estos dos fragmentos 5´y 3´obtenidos, son parcialmente solapantes entre sí, ya que sus extremos son coincidentes en las secuencias que portan la mutación. Una vez finalizadas las reacciones de PCR se purifican los fragmentos 5´y 3´a partir de geles de agarosa para evitar contaminaciones del DNA molde.

En la segunda etapa se lleva a cabo una reacción de PCR en ausencia de oligonucleótidos, incluyendo solamente entre 100 y 300 ng de cada uno de los fragmentos 5´y 3´ obtenidos en la etapa anterior. Así, debido a que ambos fragmentos hibridan entre sí por su secuencia común, uno sirve como cebador para la amplificación del otro y viceversa. Debido al menor grado de solapamiento entre ambos, la reacción estándar de PCR se ha de variar. Así, se somete a las muestras a una primera fase de desnaturalización a 98ºC durante 5 min, seguida de 10 ciclos en los que se alternan las siguientes fases: desnaturalización a 98ºC durante 1 min, hibridación a 52ºC durante 10 min y extensión a 72ºC durante 15 min, con una fase inicial de extensión a 72ºC durante 5 min. Al final de esta etapa se obtendrá un fragmento amplificado de DNA de cadena doble con la mutación deseada y cuyo tamaño corresponderá a la distancia entre los oligonoucleótidos externos.

La tercera y última fase consiste en una reamplificación del fragmento, obtenido en la etapa anterior, utilizando los cebadores externos. Para ello se realiza una nueva reacción de PCR en la que se añade como molde 1 µl de la reacción de PCR junto con los oligonucleótidos externos.

El fragmento final resultante es purificado a partir de geles de agarosa, o directamente de la mezcla de PCR y finalmente digerido con las endonucleasas de restricción adecuadas. Por último, se remplaza este fragmento, que contiene la mutación deseada por el fragmento correspondiente del DNA original.

8. MEDIDAS ELECTROFISIOLÓGICAS.

Los experimentos electrofisiológicos se realizaron a temperatura ambiente mediante la técnica de "patch-clamp" en las modalidades de "clamp" de célula entera, parche perforado y parche escindido. En algunos de los experimentos, para mejorar la estabilidad del sello y la estabilidad de los registros, las células se tripsinizaron y se resembraron en placas conteniendo cubreobjetos cubiertos de polilisina 2 a 6 h antes del experimento. Las pipetas de "patch" con una resistencia de 3 a 5 MΩ fueron fabricadas a partir de capilares de borosilicato (Boralex, Rochester Scientific, Rochester, NY, USA) en un estirador L/M-3-P-A (List Electronics, Darmstadt, Alemania).

La solución salina extracelular estándar contenía (en mM) 137 NaCl, 4 KCl, 1.8 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 10 glucosa y 10 HEPES (pH 7.4 con NaOH). Para el caso de los experimentos de célula entera y parche escindido, la solución con la que se rellenó la pipeta consistió en (en mM) 140 KCl, 2 MgCl2, 0.7 $CaCl_2$, 1.1 EGTA y 10 HEPES (pH 7.4 con KOH), lo que supone una concentración de calcio libre alrededor de 100-300 nM. En el caso de los experimentos de parche perforado, la punta de la pipeta se rellenó por capilaridad con una solución (en mM) 65 KCl, 30 K_2SO_4, 10 NaCl, 1 $MgCl_2$, 50 sacarosa y 10 HEPES (pH 7.4 con KOH). Después el electrodo se rellenó con una solución igual conteniendo además 0.3 mg/mL de nistatina (Sigma) preparada inmediatamente antes del experimento a partir de un stock concentrado de nistatina 50 mg/mL en DMSO. La solución fue sonicada exhaustivamente antes de introducirla en la pipeta. La progresión de la perforación se siguió manteniendo la pipeta a -80 mV y comprobando la evolución de la corriente capacitiva en respuesta a pulsos reiterados de despolarización de ±10 mV y 5 ms. Se necesitaron entre 5 y 20 minutos para alcanzar niveles aceptables de perforación de la membrana, en los que la resistencia en serie estimada a partir de los valores de compensación de capacidad obtenidos del circuito de compensación del amplificador, alcanzó valores menores de 40-50 MΩ. Los registros de las corrientes iónicas y del potencial de membrana se realizaron en condiciones de "clamp" de voltaje o "clamp" de corriente, respectivamente, utilizando un amplificador EPC-7 (HEKA Elektronic, Lambretch, Alemania). La estimulación y la adquisición de los datos se controlaron con el software "Pulse+PulseFit" (HEKA Elektronic) gestionado en ordenadores Macintosh. Las corrientes iónicas muestreadas a 1 KHz se obtuvieron en respuesta a los protocolos de voltaje indicados en las gráficas. El análisis de los datos se llevó a cabo con los programas PulseFit e Igor-Pro (WaveMetrics Inc).

Los parámetros cinéticos de activación y cierre se obtuvieron siguiendo la metodología previamente descrita (Viloria *et al.* 2000; Alonso-Ron *et al*. 2008, 2009; Miranda *et al*. 2005, 2008; Gomez-Varela *et al*. 2003). La dependencia de voltaje de activación de las corrientes se determinó empleando un análisis estándar de corrientes de cola, las cuales se normalizaron a su valor máximo y se ajustaron a una función Boltzmann:

$$I_{cola}/I_{max} = 1/[1 + \exp\left(\left(V_{1/2} - V\right)k\right)]$$

Donde *V* es el potencial aplicado, $V_{1/2}$ es el voltaje al que la activación es la mitad de la máxima y *k* es la pendiente. Los parámetros de cierre se obtuvieron a partir de corrientes de cola tras despolarizar la membrana a distintos potenciales con a un pulso de despolarización de 1 s a +40 mV que sitúa a los canales en un estado abierto e inactivo. Las constantes de tiempo de cierre se determinaron por medio de un ajuste biexponencial a la fase de caída de la corriente de cola según la siguiente función:

$$Y = A_f \exp\left(-T/\tau_f\right) + A_s \exp\left(-T/\tau_s\right) + C$$

Donde T es el tiempo, τ_f y τ_s las constantes de los componentes rápido y lento, A_f y A_s son las amlitudes relativas de estos componentes y C es una constante. Para simplificar, en las figuras solo se muestran los valores de las constantes de tiempo de cierre que corresponden al componente rápido del decaimiento de corriente.

9. DETECCIÓN DE INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA MEDIANTE FRET.

Todas las medidas de FRET se realizaron a temperatura ambiente (20-25ºC) y salvo en los casos en los que se indica lo contrario, con las células perfundidas de un modo constante con la solución salina extracelular utilizada en los experimentos electrofisiológicos.

9.1. Descripción del equipo de FRET.

Para realizar las mediciones de FRET en condiciones de epifluorescencia se usó un microscopio invertido Zeiss Axiovert 100 equipado con objetivos 40x/0.75 Fluar y 100x/1.45 Oil Alpha Plan Fluar (Carl Zeiss) y acoplado a un monocromador Polychrome IV (TILL-Photonics, Gräfelfing, Alemania) que permite seleccionar la longitud de onda de excitación y va equipado con una lámpara de Xenon de 150 W. Para la iluminación y recogida de las señales fluorimétricas procedentes de la pareja CFP/YFP se utilizó un juego de filtros también compatible con la iluminación por láser y la óptica de TIRF (ver más adelante), consistente en

un dicroico dual Z442/514RPC y una pareja de filtros de excitación y emisión de doble banda con unos rangos de paso de 440/30 + 514/30 (Z442/514X) y 470/40 + 560/60 (Z442/514M) respectivamente (Chroma Technology) (Figura 5A). Esta misma combinación también fue utilizada para la estimación del nivel de atenuación de la fluorescencia de la YFP (o VFP) por los colorantes $DiBAC_4(5)$ (Invitrogen) y DPA (Biotium). Por su parte, para la estimación de la fluorescencia del $DiBAC_4(5)$ simultaneada con la de la GFP (o de la GFP sola) se utilizó un juego de filtros también de doble banda consistente en un dicroico Z488/568RPC y dos filtros duales de excitación y emisión de 470/40 + 570/40 (59022X) y 520/40 + 630/60 (59022M) (Chroma Technology) (Figura 5B). La luz de emisión se hizo pasar por un separador de haces Dual View MicroImager (Optical Insights, Santa Fe, USA) y se recogió mediante una cámara CCD de 12 bits (Imago, TILL Photonics). Este separador de haces incluyó a su vez un nuevo juego de filtros comprendiendo un dicroico 505dcxr y una pareja de filtros de paso de banda D465/30 y HQ535/30 para el par CFP/YFP (Figura 5C). En el resto de casos se utilizó solamente el dicroico 565dcxr (Figura 5D).

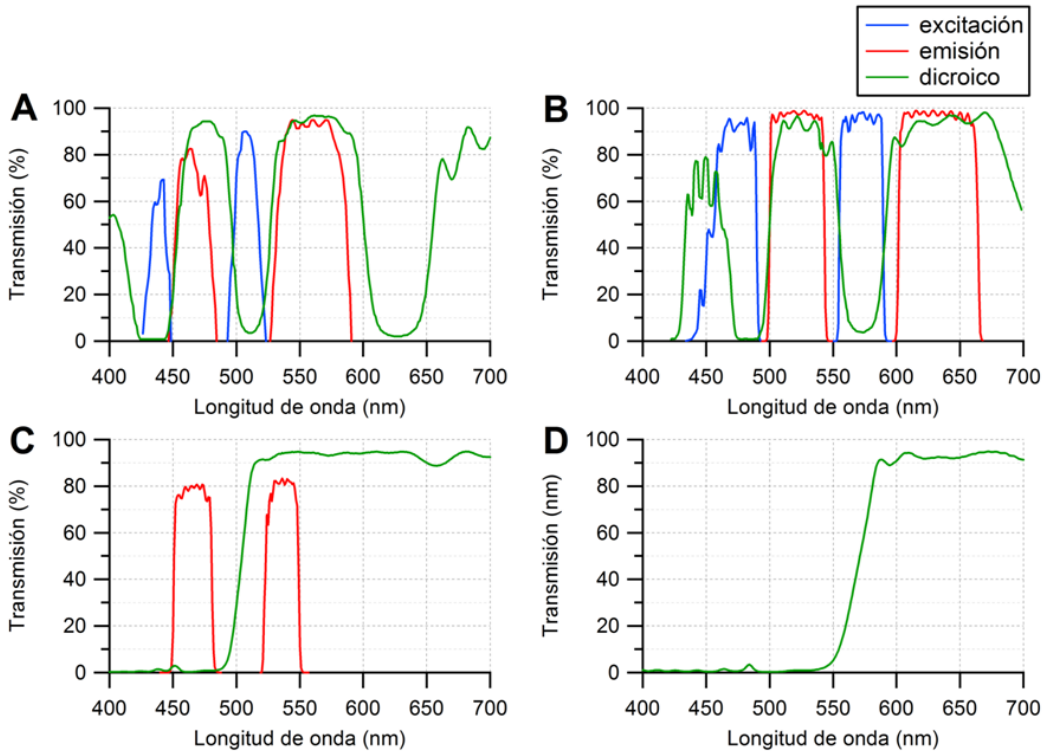


Figura 5. *Sets de filtros utilizados en las diferentes medidas de FRET. A) Filtros de excitación y emisión para la pareja CFP/YFP: Z442/514X (línea azul), Z442/514M (línea roja) y Z442/514RCP (línea verde). B) Filtros para GFP y $DiBAC_4(5)$: 59022X (en azul), 59022M (en rojo) y Z442/514RPC (en verde). C) Filtros del separador de haces para CFP y YFP: D465/30 y HQ535/30 (ambos en rojo) y 505dcxr (en verde). D) Filtros del separador de haces para $DiBAC_4(5)$: 565dcxr (en verde).*

9.2 Medidas de FRET en condiciones de epifluorescencia.

Para la realización de las medidas de FRET intersubunitario se utilizó la variante de la técnica de "fotoblanqueo del aceptor" como ha sido descrito previamente (Miranda *et al*. Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo. 2007). Así cuando dos fluoróforos cumplen las condiciones necesarias para la existencia de FRET, al ser excitado el donador, éste emitirá fluorescencia y energía que captará el aceptor. Sin embargo, si el aceptor es destruido o fotoblanqueado (mediante pulsos de luz intensos y/o prolongados a su longitud de onda de excitación) y a continuación se vuelve a excitar el donador, se puede observar un incremento en la fluorescencia emitida por éste debido a la eliminación del aceptor al que se transfería parte de la energía de excitación. Este incremento en la fluorescencia del donador demuestra inequívocamente la existencia de FRET previa a la fotodestrucción del aceptor. El protocolo estándar de fotoblanqueo del aceptor usando el objetivo de 40 aumentos consistió en 30 ciclos de 2 s con 50-100 ms de exposición del donador y del aceptor cerca de sus máximos de excitación (440 y 515 nm respectivamente, ver Figura 6) para detectar inicialmente la fluorescencia de CFP e YFP sin blanqueo del aceptor, seguido de 180 a 240 ciclos adicionales separados por períodos en los cuales la YFP permaneció permanentemente iluminada a 515 nm para fotodestruirla. La recogida de las imágenes se llevó a cabo con un nivel de "binning" de 4x4 para mejorar la señal sin aumentar los tiempos de exposición. Cuando este procedimiento se llevó a cabo con el objetivo de 100 aumentos, y debido a la reducida profundidad de campo del mismo, fue necesario tomar imágenes a diferentes planos de enfoque en cada ciclo para poder corregir el inevitable desenfoque a lo largo del experimento. Por ello, al final de cada ciclo se tomaron 11 imágenes con una exposición de 100 ms y con una separación vertical de 1 µm. En dicha adquisición se utilizó un dispositivo piezoeléctrico de enfoque (z-stack) controlado mediante el software TillVisION y la tarjeta correspondiente insertada en el monocromador Polychrome IV. Esto obligó asimismo a reducir el número de ciclos a 5 con un intervalo entre ellos de 30 s para evitar problemas de fotoblanqueamiento del donador durante el establecimiento de la línea de fluorescencia base, seguidos de otros 12 durante el blanqueamiento del aceptor.

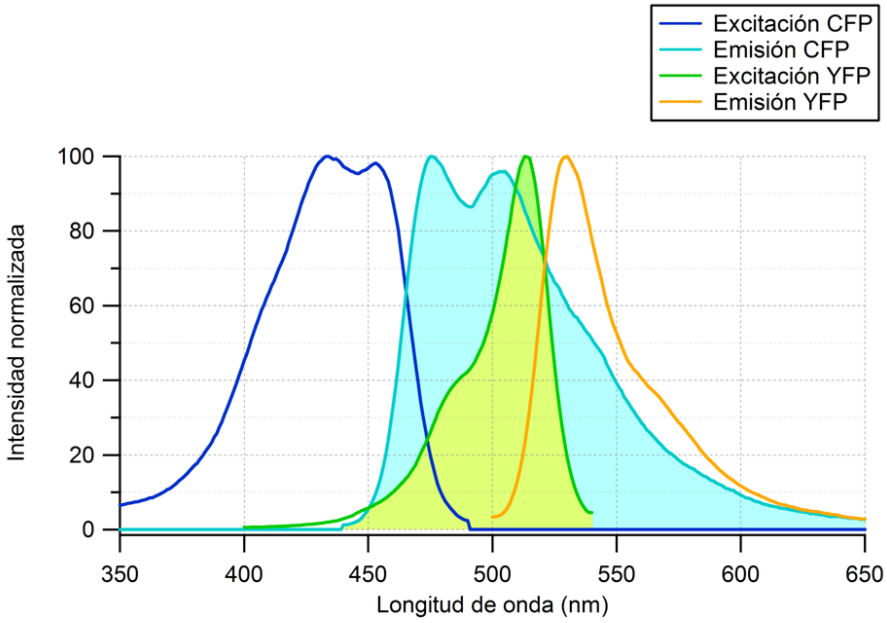


Figura 6. *Solapamiento de los espectros de excitación y emisión de CFP e YFP. Se muestran los espectros de excitación (azul oscuro) y emisión (azul claro) de la CFP junto con el espectro de excitación (verde) y de emisión (naranja) de la YFP. La zona coloreada en verde claro corresponde al solapamiento entre los espectros de emisión de la CFP y excitación de la YFP que permite la transferencia de energía entre ambos. Nótese el solapamiento entre los espectros de emisión de la CFP y la YFP, así como el pequeño solapamiento entre los respectivos espectros de excitación.*

Para la estimación de la variación del nivel de FRET entre distintos residuos de hERG respecto a la membrana plasmática, se midió directamente el aumento o disminución de la fluorescencia de la proteína fluorescente unida a un determinado residuo al añadir o mover al colorante $DiBAC_4(5)$ o DPA. En los experimentos "largos" se tomaron imágenes cada 60 s con un tiempo de exposición de 100 ms y utilizando "binning" 4x4. En los experimentos en que se intentaron medir variaciones muy rápidas en el nivel de fluorescencia, se tomaron imágenes cada 72 ms con un tiempo de exposición de 50 ms a un nivel de "binning" de 8x8 y utilizando tan sólo una pequeña ventana de la cámara correspondiente a 50 x 50 píxeles a ese "binning". El uso del alto nivel de "binning" respondió a dos razones: Por una parte el bajo tiempo de exposición da lugar a una señal de YFP muy débil que debe ser promediada lo suficiente como para obtener una imagen que permita el posterior análisis. Por otro lado, un alto nivel de "binning" permite forzar una recogida más rápida de imágenes. El restringir la cantidad de señal que es procesada a una pequeña ventana también permite aumentar la frecuencia de muestreo de la cámara, llegando a un límite práctico de 72 ms.

9.3 Combinación de TIRF-FRET.

En el caso de los experimentos en que se combinó la tecnología de TIRF con las medidas de FRET se usó el mismo sistema de microscopía, con la salvedad de que en este caso como fuente de iluminación se utilizó un juego de láseres consistente en un láser multilínea de argón (514 nm – 100 mW, Lasos Lasertechnik, Jena, Alemania) para la iluminación de la YFP y un láser en estado sólido para la excitación de la CFP (442 nm – 50 mW, Toptica Photonics, Grafelfing, Alemania), ambos combinados en el inicio de la fibra óptica mediante un modulador acusto-óptico (Till-Photonics). La luz de los láseres y la del monocromador fueron combinadas en un condensador dual (Till-Photonics) y enviadas a la preparación a través del objetivo de alta apertura numérica (100x/1.45 Oil Alpha Plan Fluar, Zeiss) necesario para el TIRF. El condensador de TIRF incluye los micrométricos de ajuste del ángulo de incidencia sobre la interfase vidrio-agua. Asimismo y debido a la particularidad de la iluminación mediante láser y la necesidad de mantener el haz sin dispersión, el sistema de iluminación cuenta en este caso con un juego de filtros y dicroicos duales para el par CFP/YFP con un cubrimiento compatible con la citada iluminación (ver apartado anterior). El protocolo utilizado en estos experimentos conllevó la toma de una imagen inicial del aceptor con una exposición de 100 ms, seguido de la adquisición de una secuencia vertical de imágenes (z-stack) en un rango de 1 µm a intervalos de 0.1 µm, con la fluorescencia del donador en respuesta a una exposición de 300 ms. Nuestras medidas iniciales indicaron que el nivel de blanqueamiento de la CFP fue inapreciable en estas condiciones. Por último, el aceptor se fotoblanqueó durante una exposición continua de 90 s con el láser de 514 nm, combinado con la iluminación de la lámpara del monocromador también a 514 nm. Como ha sido indicado previamente por otros autores (Fowler *et al*. 2007), esta combinación incrementa notablemente la eficiencia del fotoblanqueamiento, a la vez que evita la llegada al plano de TIRF de fluoróforos sin blanquear procedentes de niveles superiores del interior de la célula, que son fotodestruidos por la luz del monocromador. Al final de este período se estimó nuevamente el nivel de fluorescencia del donador en una secuencia vertical de imágenes como la ya descrita anteriormente.

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante el programa InStat (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). En las gráficas los datos numéricos se representan como media ± s.e.m. (error estándar de la media), con *n* indicando el número de células excepto en los experimentos de FRET con DPA en “clamp” de voltaje, en los cuales *n* es el número de

pulsos aplicados y *N* el número de células usadas. *p* indica el nivel de significación obtenido mediante los distintos test de comparación empleados.

Las comparaciones entre grupos de datos se hicieron inicialmente mediante el test paramétrico *t* de Student para datos desapareados y dos colas. Cuando debido a la dispersión de datos las varianzas no eran homogéneas, de acuerdo con el test de Barlett, se empleó alternativamente o un test *t* de Welch que asume poblaciones gaussianas con desviaciones estándar no homogéneas, o bien un test no paramétrico Wilcoxon o Mann-Whitney. En todos los casos, se consideraron estadísticamente significativas las diferencias cuando el valor de *p* era menor que 0.05.

RESULTADOS

1. TIRF-FRET EN EL ESTUDIO DE LA ARQUITECTURA MOLECULAR DE LOS DOMINIOS CITOPLÁSMICOS DE hERG.

Como se ha comentado en la introducción, la técnica de FRET puede ser empleada para el estudio de la arquitectura molecular de una proteína. Sin embargo, el estudio mediante epifluorescencia de las señales fluorimétricas de una proteína localizada en la membrana plasmática como hERG, presenta el inconveniente de que al ser atravesada toda la muestra por la luz de excitación, independientemente del plano focal, la imagen obtenida aparecerá contaminada con fluorescencia procedente de otras zonas no enfocadas de la célula. Esto podría suponer que no sólo los tetrámeros del canal correctamente ensamblados en la membrana plasmática, sino también subunidades no ensambladas, en tránsito o mal ensambladas, contribuyan a la señal de fluorescencia registrada, lo cual dificultaría la interpretación de la señal fluorescente como indicador de la distancia entre fluoróforos. Un modo de evitar o al menos reducir estos inconvenientes, sería el empleo de un sistema de iluminación por TIRF, el cual permitiría restringir las señales de fluorescencia registradas a aquellas generadas por fluoróforos localizados en la membrana plasmática o al menos muy próximos a ella.

1.1 Implementación de un sistema de TIRF.

El primer paso en la implantación de un sistema que permita realizar experimentos de FRET bajo condiciones de TIRF en que se ilumine de un modo selectivo a la membrana plasmática, consistió en la comparación de imágenes obtenidas en condiciones de TIRF y epifluorescencia, para confirmar así que la fluorescencia procedente de otras localizaciones celulares alejadas de la membrana plasmática en contacto con el cubreobjetos, es eliminada al utilizar la iluminación por TIRF.

En la Figura 7 se muestran dos células HEK293 transfectadas con el receptor de TRH (una proteína cuya expresión se restringe casi exclusivamente a la membrana plasmática) marcado con YFP. Como se puede observar, tras enfocar la zona de la célula en contacto con el cubreobjetos, la contaminación de fluorescencia procedente de planos superiores que se observa en condiciones de epifluorescencia, desaparece completamente cuando la misma imagen se obtiene en condiciones de TIRF. Comparando ambas imágenes, se puede apreciar que las imágenes de TIRF presentan una notable reducción del ruido de fondo de la imagen, además de un gran aumento de la nitidez del contorno de la membrana plasmática. Es decir, en condiciones de TIRF se obtiene una imagen clara y nítida, que corresponde exclusivamente

a la zona que está enfocada, eliminándose el resto de señales de fluorescencia procedentes de otras partes de la célula.

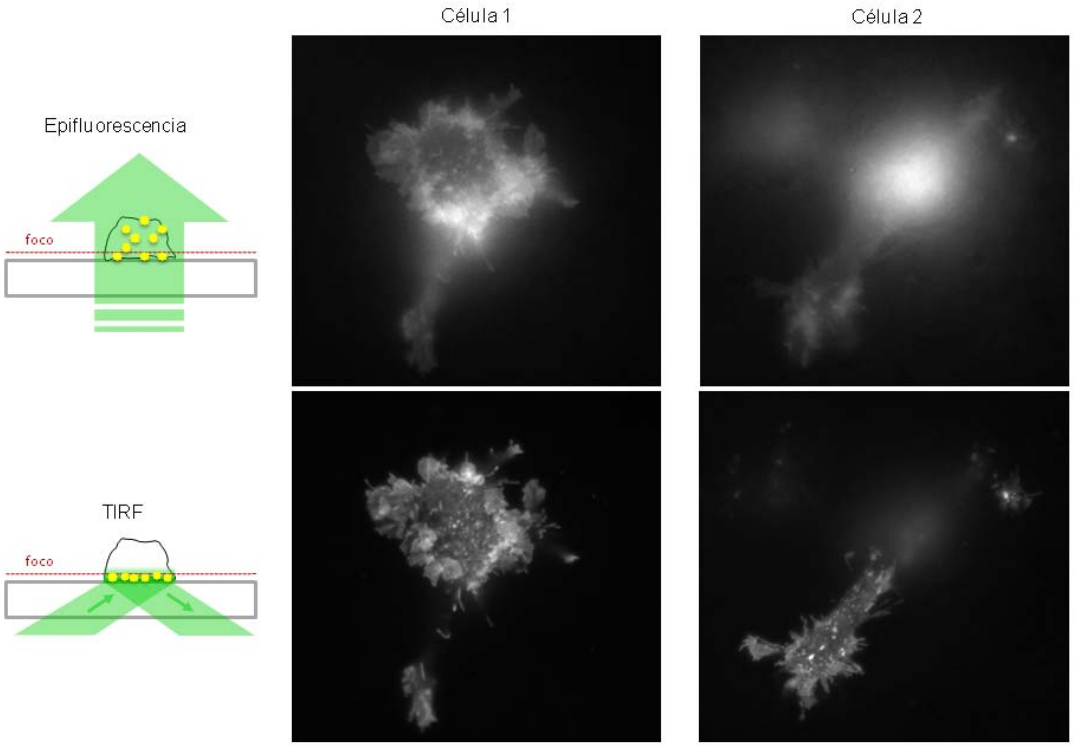


Figura 7. *Comparación de imágenes obtenidas bajo condiciones de epifluorescencia y de TIRF. Las imágenes corresponden a dos células HEK293 transfectadas con el repector de TRH fusionado a YFP en su extremo carboxilo. Las imágenes se han obtenido iluminando a 514 nm en el mismo plano focal correspondiente a la interfase vidrio-agua en condiciones de epifluorescencia (arriba) y de TIRF (abajo).*

A continuación, intentamos comprobar si la imagen de TIRF corresponde realmente sólo a la región iluminada por la onda evanescente generada en condiciones de TIRF de unos 200 nm de grosor en la zona de contacto con el cubreobjetos. Es decir, si el haz de luz procedente del láser es reflejado completamente al incidir en la interfase vidrio-agua, o si por el contrario sigue habiendo un componente de epifluorescencia que ilumina zonas alejadas de dicha interfase. La ausencia de epifluorescencia implicaría asimismo que el ángulo crítico esté en un valor óptimo y que no se produzca una penetración de parte del haz del láser en la preparación excitando fluoróforos de planos focales superiores. Por ello, como se muestra en la Figura 8, estudiamos la capacidad del láser para, irradiando en condiciones de TIRF, fotoblanquear selectivamente la fluorescencia de la YFP de la zona de la membrana plasmática

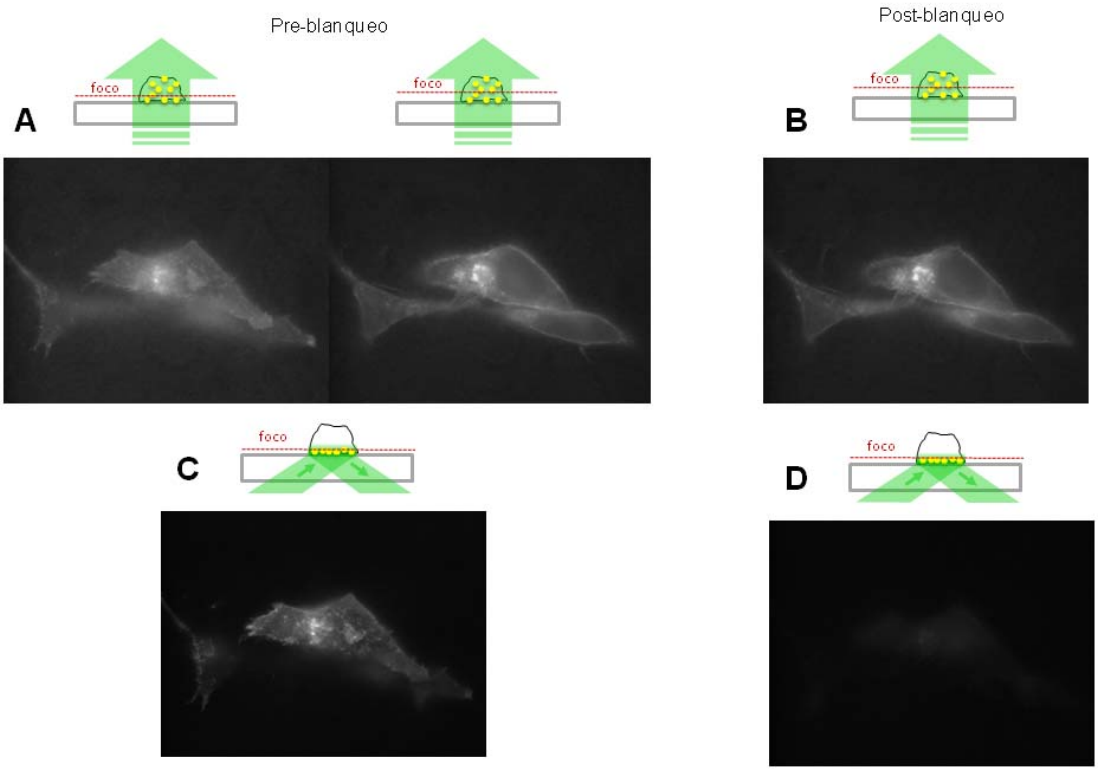


Figura 8. *Fotoblanqueamiento selectivo de la señal de TIRF en la zona de contacto con el cubreobjetos. Imágenes de células HEK293 transfectadas con el receptor de TRH marcado con YFP en su extremo carboxilo. A) Imagen de epifluorescencia antes del fotoblanqueo con el enfoque localizado en la zona de contacto con el cubreojetos (izquierda) y cerca del ecuador de la célula (derecha). B) Imagen de epifluorescencia después de fotoblanqueo con el enfoque cerca del ecuador de la célula. C) Imagen de TIRF antes del fotoblanqueo. D) Imagen de TIRF tras el fotoblanqueo con el láser irradiando de forma contínua durante varios minutos.*

en contacto con el cubreobjetos. En este caso obtuvimos imágenes de las células en condiciones de epifluorescencia con el enfoque localizado tanto en la zona de contacto de la membrana con el cubreobjetos, como en el ecuador de la célula (Fig. 8A), y en condiciones de TIRF con el enfoque en dicha zona de contacto con el cubreobjetos (Fig. 8C). A continuación, procedimos a fotoblanquear al fluoróforo (YFP unido al receptor de TRH) mediante una iluminación mantenida durante varios minutos con el láser de 514 nm y en las condiciones de TIRF. Una vez fotodestruida la YFP (Fig. 8D), se cambió el plano de enfoque de nuevo a una zona superior de la célula cercana al ecuador de la misma, donde presumiblemente la iluminación por TIRF no habría llegado y en la que por tanto no debería haber habido fotoblanqueo (Fig. 8B). Se puede observar que la fluorescencia de la YFP en estas condiciones de epifluorescencia y en el plano ecuatorial de la célula es prácticamente igual antes y después del fotoblanqueo. Esto demuestra que efectivamente la luz del láser es reflejada en la interfase

vidrio agua en TIRF y que realmente este caso el haz de excitación no penetra a planos focales superiores en los que la YFP permanece básicamente inalterada.

Así pues, puesto que los fluoróforos localizados en planos focales más altos que la interfase vidrio-agua iluminada con el TIRF permanecen a salvo de la fotodestrucción ante una radiación intensa y continuada, podemos concluir que en condiciones de TIRF se ilumina selectivamente la zona de la célula en contacto con el cubreobjetos , consiguiendo que los fluoróforos presentes en otros planos focales no sean excitados y que por tanto no contribuyan a la señal registrada.

1.2 Combinación del sistema de TIRF con la tecnología de FRET.

Una vez implementado el TIRF y comprobada su especificidad para excitar a los fluoróforos localizados a nivel de la membrana plasmática procedimos a combinarlo con la tecnología de FRET. Para ello, llevamos a cabo experimentos de FRET similares a los realizados previamente en el laboratorio en condiciones de epifluorescencia, pero cambiando la fuente y condiciones de iluminación por las requeridas para lograr una iluminación por TIRF. Además, fue necesario variar adecuadamente los protocolos empleados para la excitación y recogida de fluorescencia que se habían venido usando en los experimentos de epifluorescencia (ver Métodos). Estas modificaciones en los protocolos son necesarias para solventar algunas complicaciones que presenta el uso del TIRF, como son: a) la elevada tasa de fotoblanqueamiento de los fluoróforos debida a la intensidad de la iluminación propia del láser, y b) el hecho de que el más ligero desenfoque de la imagen puede modificar el plano de enfoque hacia zonas de la célula no iluminadas por la onda evanescente y, por tanto, que no solo se desenfoque la imagen, sino que además se pierda por completo la señal de fluorescencia. Estos inconvenientes complican a nivel metodológico y técnico el uso de este sistema, sobre todo en experimentos realizados a tiempos relativamente largos como son los necesarios para el registro de FRET, particularmente en el caso de detección de FRET por fotoblanqueo del aceptor, en el cual se tiende a adquirir repetidamente señales fluorimétricas a fin de seguir la evolución temporal de la fluorescencia del donador y del aceptor, para poder extrapolarlas a un nivel de fluorescencia del aceptor cero, para evitar el error en la cuantificación del FRET que pudiese causar un blanqueamiento incompleto del aceptor (Miranda *et al*. 2008).

En la Figura 9 se recoge un experimento representativo de TIRF-FRET. Se muestra la fluorescencia del donador (CFP) y el aceptor (YFP) de una célula HEK293 transfectada con una construcción de hERG doblemente etiquetado en sus extremos amino y carboxilo con YFP y

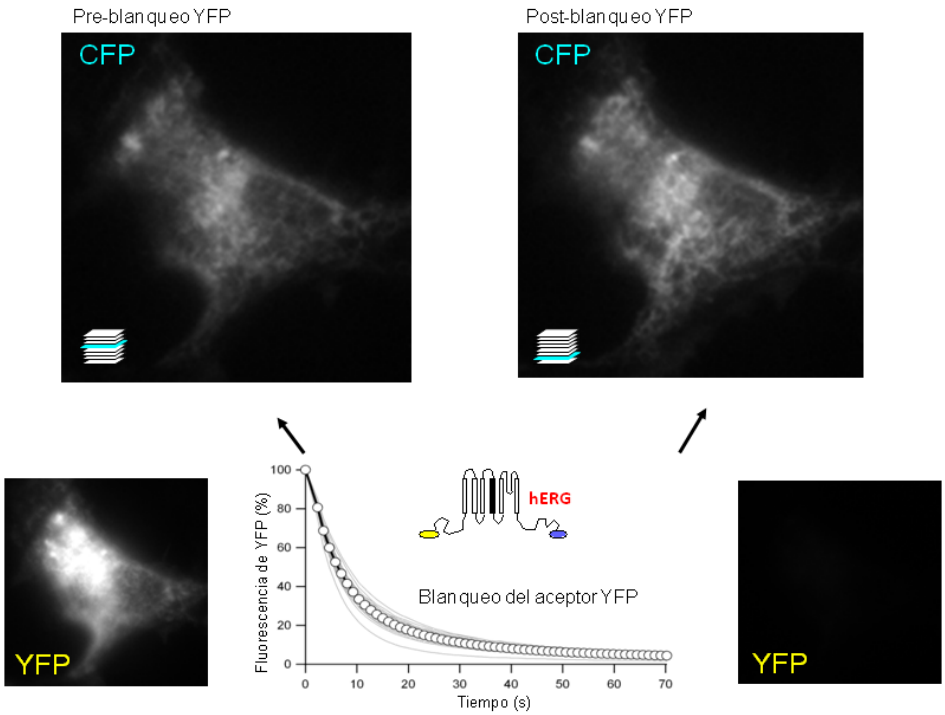


Figura 9. *Implementación del TIRF/FRET. Las imágenes corresponden a una célula transfectada con el canal hERG doblemente marcado con YFP en su extremo amino y con CFP en el carboxilo (ver esquema central). Las imágenes de la izquierda corresponden a la intensisdad de fluorescencia del donador (CFP, arriba) y del aceptor (YFP, abajo) antes de fotoblanquear este último. Abajo en el centro se muestra el curso temporal del fotoblanqueo de YFP mediante la iluminación combinada con el láser y el monocromador a 514 nm durante 70 s. A la derecha se muestran las intensidades de fluorescencia correspondientes al donador (arriba) y al aceptor (abajo) después de la fotodestrucción de la YFP. Los fotogramas superiores (fluorescencia de CFP) corresponden a las imágenes mejor enfocadas «z-stack», ilustrado esquemáticamente mediante el acúmulo de planos en la esquina inferior izquierda de cada recuadro.Para más detalles ver Métodos.*

CFP respectivamente. Se puede observar que tras un fotoblanqueamiento prácticamente completo del aceptor YFP (ver la evolución temporal de la fluorescencia de la YFP en la parte inferior central de la figura) mediante una irradiación mantenida con el láser de 514 nm combinada con la iluminación procedente del monocromador de epifluorescencia a la misma longitud de onda (ver Métodos), los niveles de fluorescencia del donador CFP aumentan sensiblemente respecto a los niveles anteriores al fotoblanqueo. Este aumento de fluorescencia del donador es un indicador muy fiable de la presencia de FRET entre ambos fluoróforos previa a la fotodestrucción del aceptor YFP, ya que al desaparecer este último, la energía que el donador le transfería se libera ahora en forma de fluorescencia. Es importante hacer notar que la combinación de ambos medios de iluminación para el fotoblanqueo del aceptor es importante para asegurar que todas las moléculas del aceptor presentes en la

célula sean fotodestruidas, ya que si solo se fotoblanquean las presentes en la zona de la membrana plasmática, podrían ser eventualmente sustituidas por otras moléculas de YFP procedentes de otras zonas de la célula, manteniendo la atenuación de la CFP y falseando los datos de la cuantificación de los niveles de FRET. Datos correspondientes a dicha cuantificación utilizando el promedio de la fluorescencia de todos los píxeles incluidos en el contorno de la célula y comparando las imágenes antes y después del blanqueo de la YFP, son presentados en apartados posteriores.

1.3 Ausencia de fotoconversión de YFP a CFP en condiciones de TIRF.

Se ha descrito que la excitación continuada de la YFP, particularmente mediante láser, puede dar lugar a su fotoconversión en CFP (Valentin *et al*. 2005). Este fenómeno tendría especial importancia en la interpretación del aumento de fluorescencia del donador en los experimentos de FRET por fotoblanqueamiento del aceptor ya que de producirse, el largo período de fotoblanqueo de la YFP podría aumentar el nivel de fluorescencia de la CFP no por la liberación de la energía transferida a la YFP por FRET, sino por la aparición de nuevas moléculas de donador debido a la conversión de YFP en CFP. No obstante, algunos autores afirman que el fenómeno no tiene lugar en cantidad apreciable existiendo controversia importante al respecto (Thaler et al. 2006; Verrier y Soling 2006; Kirber et al. 2007). De hecho, en nuestro laboratorio hemos observado previamente que en condiciones de epifluorescencia no se produce dicha fotoconversión de YFP en CFP (P. Miranda. Tesis Doctoral, 2007. Universidad de Oviedo). No obstante y como se ilustra en la Figura 10, realizamos un experimento para comprobar que en el caso de iluminación por TIRF mediante láser y en nuestras condiciones técnicas, el aumento de la fluorescencia de la CFP tras la fotodestrucción de YFP tampoco es debida a la fotoconversión de una proteína fluorescente en otra durante la iluminación mantenida. Para ello, de un modo análogo al empleado en los experimentos de TIRF/FRET, fotoblanqueamos la YFP fusionada al extremo amino de un canal hERG transfectado en células HEK293 y en ausencia de CFP. Como se observa en el panel correspondiente al canal de emisión de la CFP, tras el fotoblanqueamiento de la YFP no se observa un aparición de fluorescencia de CFP al excitar la preparación a 440 nm (longitud de onda correspondiente al máximo de excitación de la variante cian de la proteína fluorescente). Estos resultados permiten pues descartar que los incrementos de fluorescencia del donador durante nuestros experimentos de TIRF/FRET y en nuestras condiciones experimentales se deban a una fotoconversión de YFP en CFP.

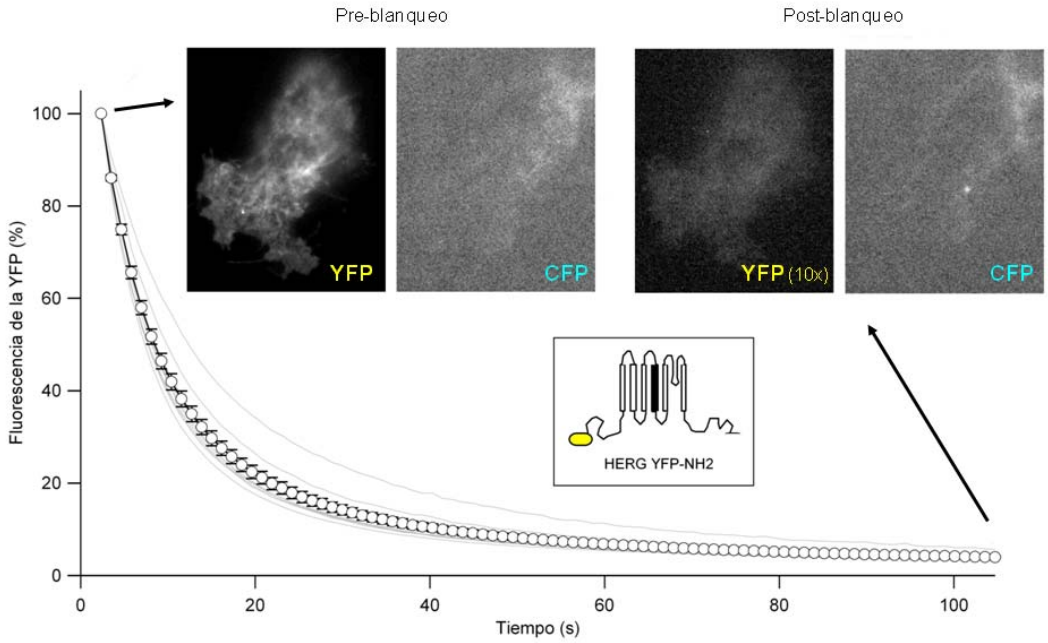


Figura 10. *Ausencia de interconversión de YFP en CFP durante el fotoblanqueamiento del aceptor en las condiciones de iluminación utilizadas en los experimentos de TIRF/FRET. Las imágenes corresponden a células HEK293 transfectadas con el canal hERG portando únicamente YFP en su extremo amino. Se muestra el curso temporal del fotoblanqueo de la YFP mediante el láser de 514 nm y en las condiciones utilizadas en los experimentos de TIRF. A la izquierda se muestran las imágenes correspondientes a la fluorescencia de la YFP y CFP antes del fotoblanqueo. A la derecha la fluorescencia de YFP y CFP tras el fotoblanqueo. Nótese que en la imagen de fluorescencia de la YFP tras el fotoblanqueo la intensidad remanente ha sido multiplicada por 10 y que no se observa un nivel apreciable de fluorescencia en las imágenes correspondientes a la CFP ni antes ni después del fotoblanqueo.*

1.4 Ausencia de TIRF/FRET entre proteínas no interaccionantes.

Un control adicional confirmando que los niveles de incremento de la fluorescencia del donador tras el fotoblanqueo del aceptor se deben a la existencia previa de FRET específico entre ambos fluoróforos, consistió en el estudio de los niveles de TIRF/FRET entre fluoróforos de dos proteínas que *a priori* ni interaccionan ni están lo suficientemente cercanas entre sí, y por tanto entre las que se espera que el nivel de FRET sea nulo. Este control lo realizamos utilizando como pareja de fluoróforos al canal hERG etiquetado con YFP en su extremo amino como aceptor, y como donador al receptor de TRH portando CFP en su extremo carboxilo. Se puede observar que en este caso, la fotodestrucción del aceptor no va acompañada de ningún aumento en el nivel de fluorescencia del donador (Figura 11), observándose tan solo un pequeño descenso de ésta (-2.63 ± 1.15%), probablemente debido al ligero blanqueo del propio donador al ser excitado repetidamente durante el enfoque de la imagen de TIRF del mismo.

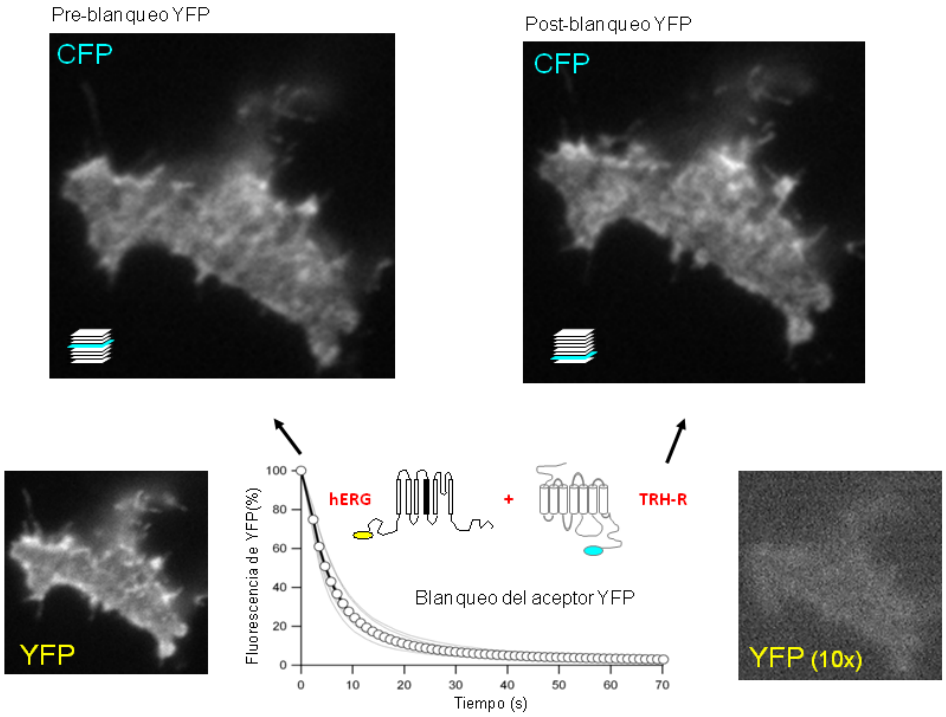


Figura 11. *Ausencia de TIRF/FRET entre dos proteínas no interaccionantes. Las imágenes corresponden a una célula HEK293 co-transfectada con el canal hERG marcado con YFP en su extremo amino y con el receptor de TRH portando CFP en el carboxilo (ver esquema central de la parte inferior). Las imágenes de la izquierda corresponden a la intensidad de fluorescencia del donador (CFP, arriba) y del aceptor (YFP, abajo) antes de fotoblanquear este último. Abajo en el centro se muestra el curso temporal del fotoblanqueo de la YFP mediante la iluminación combinada con el láser y el monocromador a 514 nm durante 70 s. A la derecha se muestran las imagenes de fluorescencia correspondientes al donador (arriba) y al aceptor (abajo) después de la fotodestrucción de la YFP. Los fotogramas superiores (fluorescencia de CFP) corresponden a las imágenes mejor enfocadas de una serie de imágnes sucesivas en distintos planos de enfoque ("z-stack"), ilustrada esquemáticamente mediante el acúmulo de planos en la esquina inferior izquierda de cada recuadro. Nótese que en la imagen de fluorescencia de la YFP tras el fotoblanqueo, la intensidad remanente ha sido multiplicada por 10.*

1.5 Cuantificación de los niveles de FRET en condiciones de TIRF y comparación con los niveles obtenidos en epifluorescencia.

Una vez implementada la combinación TIRF/FRET y elaborados los controles descritos anteriormente, procedimos a cuantificar los niveles de FRET en una población de varias células con distintas construcciones de hERG portando CFP e YFP en distintas posiciones. Comparamos asimismo los niveles de FRET obtenidos con los datos previos medidos en condiciones de epifluorescencia (Miranda *et al*. 2008). En primer lugar se utilizó una construcción del canal hERG doblemente marcada con YFP y CFP (en los extremos amino y carboxilo respectivamente) y como control negativo la pareja no interaccionante hERG con YFP en su extremo amino y receptor de TRH con CFP en su extremo carboxilo (Figura 12). Nótese que en los datos previos en epifluorescencia que se muestran para su comparación, el control negativo fue realizado con el receptor de vanilloides tipo I, (VR1 o TRPV1, otra proteína de

membrana que al igual que ocurre con el receptor de TRH no se espera que interaccione con hERG. En ambos casos se espera una similar ausencia de FRET o unos niveles que correspondan al FRET no específico. Los resultados obtenidos indican que en el caso del FRET en condiciones de TIRF, el incremento de fluorescencia del donador en el canal doblemente etiquetado corresponde a 16 .19 ± 1.5 %, un nivel muy similar al observado en condiciones de epifluorescencia (15.64 ± 1.34 %). Esto indica que los niveles de FRET en ambas condiciones son equiparables. Sin embargo debe hacerse notar que en el caso del control negativo para TIRF (cotransfección de hERG y receptor de TRH), se obtiene un incremento de fluorescencia ligeramente negativo (-2.63 ± 1.15 %), mientras que en epifluorescencia y con hERG y VR1 se obtiene un ligero incremento de fluorescencia correspondiente al FRET inespecífico de 3.92 ± 0.47 %. Esta pequeña diferencia y en especial el hecho de que en TIRF el incremento sea ligeramente negativo sugiere que hay un pequeño blanqueamiento de la CFP durante el desarrollo del experimento, por lo tanto se podría estar infravalorando el nivel de FRET medido bajo condiciones de TIRF. Esto sería consistente con el hecho de que en TIRF sólo se obtiene señal de fluorescencia de los canales presentes en la membrana plasmática correctamente ensamblados y no de otras subunidades no ensambladas y localizadas en otros compartimentos celulares, lo cual ayudaría a que el nivel de FRET en TIRF fuese algo superior al no estar contaminada la señal con la de otras subunidades del canal presentes en otras regiones de la célula.

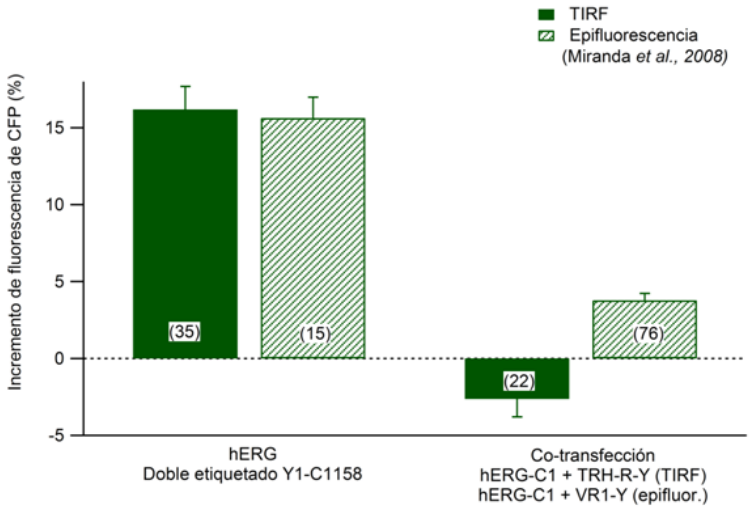


Figura 12. *Comparación cuantitativa de los niveles de FRET en condiciones de TIRF y epifluorescencia. En el histograma se muestran los valores del incremento de fluorescencia del donador (CFP) tras el fotoblanqueo del aceptor (YFP) correspondientes a un canal hERG doblemente etiquetado con YFP en su extremo amino y CFP en su extremo carboxilo. Los controles corresponden a dos proteínas no interaccionantes entre sí; el canal hERG etiquetado con CFP en su extremo carboxilo bien con el receptor de TRH portando YFP en su extremo carboxilo o bien con el receptor de vanilloides tipo I fusionado a VFP. Los datos de epifluorescencia han sido reproducidos de Miranda et al. 2008.*

Una vez realizada esta comparación de los resultados de FRET utilizando ambos tipos de iluminación, procedimos a comparar los niveles de FRET tanto en condiciones de epifluorescencia como de TIRF con otras construcciones fluorescentes de hERG. Para ello, se utilizaron tres de los canales doblemente marcados usados previamente para estudiar el posicionamiento relativo de los residuos 1, 345, 905 y 1158 (Miranda *et al*. 2008). La cuantificación de los incrementos de fluorescencia del donador en estos experimentos y el cálculo posterior de la eficiencia de FRET indica que en el caso de los canales hERG doblemente etiquetados Y1-C1158 y C345-V1158, el nivel de FRET es de nuevo ligeramente mayor en el caso de la iluminación por TIRF, aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa (Figura 13). Sin embargo, en el caso del canal doblemente marcado C1-V905 los niveles de FRET son significativamente distintos al comparar el TIRF con los datos de epifluorescencia obtenidos previamente (Miranda *et al*. 2008), siendo los valores en epifluorescencia superiores que en TIRF (Figura 13). Este resultado nos hizo plantearnos si esta discrepancia pudiera ser debida a que los experimentos se hubiesen realizado muy distantes en el tiempo y en células distintas. Para comprobar si éste era el caso y gracias a que mediante el empleo de TIRF podemos fotoblanquear solo la zona de la célula enfocada en contacto con el cubreobjetos y no otras (ver Figura 14), medimos secuencialmente y en las mismas células el FRET mediante TIRF y epifluorescencia. Así, tras el experimento de TIRF/FRET fotoblanqueando al aceptor con el láser y sin usar para ello la luz de epifluorescencia (para no fotodestruir la YFP del resto de la célula), se cambió el plano de enfoque a uno más alto en que los fluoróforos no habían sido irradiados y por tanto se mantienen intactos, y se repitió la medida de FRET en la forma convencional con epifluorescencia. En estas condiciones, se observó ahora para la construcción C1-V905 un nivel de FRET de nuevo superior en condiciones de TIRF que en epifluorescencia (Figura 14), aunque las diferencias no alcanzaron tampoco una significación estadística. Como un control adicional para este tipo de experimento combinando TIRF y epifluorescencia, se estudiaron asimismo los niveles de FRET con una construcción en tándem YFP-CFP portando una señal de anclaje a la membrana plasmática procedente de la proteína G pequeña Rho. Esta construcción, denominada Rho-pYC, se espera que tenga una expresión restringida a la membrana plasmática, y que se detecten niveles similares de FRET procedentes de la misma localización subcelular tanto en condiciones de TIRF como de epifluorescencia. Como se muestra en la Figura 14C, efectivamente los niveles de FRET con este tándem y en la misma célula son muy similares utilizando ambos tipos de iluminación.

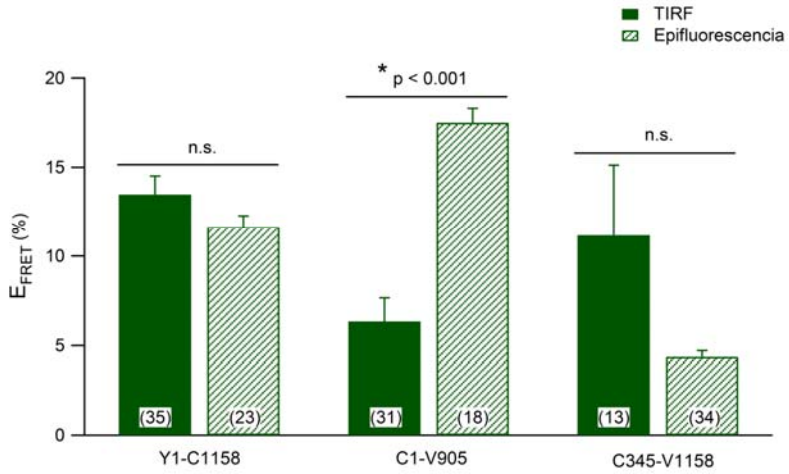


Figura 13. *Comparación de los niveles de FRET en condiciones de TIRF (verde sólido) y de epifluorescencia (verde rayado) con diferentes construcciones de hERG. Se muestran las eficiencias de FRET calculadas a partir del incremento de la fluorescencia de CFP tras el fotoblanqueo de Y/VFP. Los datos corresponden a tres construcciones de hERG doblemente etiquetadas: Con YFP en el extremo amino y CFP en carboxilo (Y1-C1158), con CFP en el amino y VFP en la posición 905 (C1-V905), y con CFP en posición 345 y VFP en el carboxilo (C345-V1158). Los datos de epifluorescencia han sido reproducidos de Miranda et al. 2008. (n.s.: no significativo).*

Es importante hacer notar que si bien este procedimiento resultó útil para aclarar las discrepancias entre los valores de FRET obtenidos en distintos momentos, no fue adoptado de forma general como sistema de la cuantificación del FRET por varias razones. En primer lugar, el protocolo utilizado y el posterior análisis de los datos es demasiado laborioso para tomarse como norma estándar de uso. Además, como se aprecia en los paneles superiores correspondientes al TIRF en la Figura 14, el blanqueo del aceptor exclusivamente en la zona de la membrana plasmática presentó una cinética compleja y variable, alcanzando solo un nivel parcial en comparación con el obtenido con el monocromador o con la combinación láser/monocromador (e.g. ver Figura 11). Las razones de este comportamiento no están claras, pero es posible que pequeñas variaciones en el plano de enfoque o en el ángulo de incidencia del haz láser en condiciones de TIRF influyan de modo sustancial en el blanqueo. Asimismo, es posible que en el transcurso del fotoblanqueo exclusivamente con el láser, moléculas del aceptor fotodestruidas sean sustituidas por otras provenientes de planos superiores y que permanecen intactas. Además, dado que por razones técnicas este sistema no permite seguir la evolución temporal de la fluorescencia del donador para poder establecer una correlación líneal entre ésta y la del aceptor, y por ello no es factible extrapolar el incremento de la fluorescencia del donador a un nivel teórico de 100% de fotoblanqueo (ver Miranda *et al*. 2008), consideramos que los niveles de FRET obtenidos en condiciones de TIRF resultan útiles a nivel cualitativo siendo su cuantificación tan sólo orientativa.

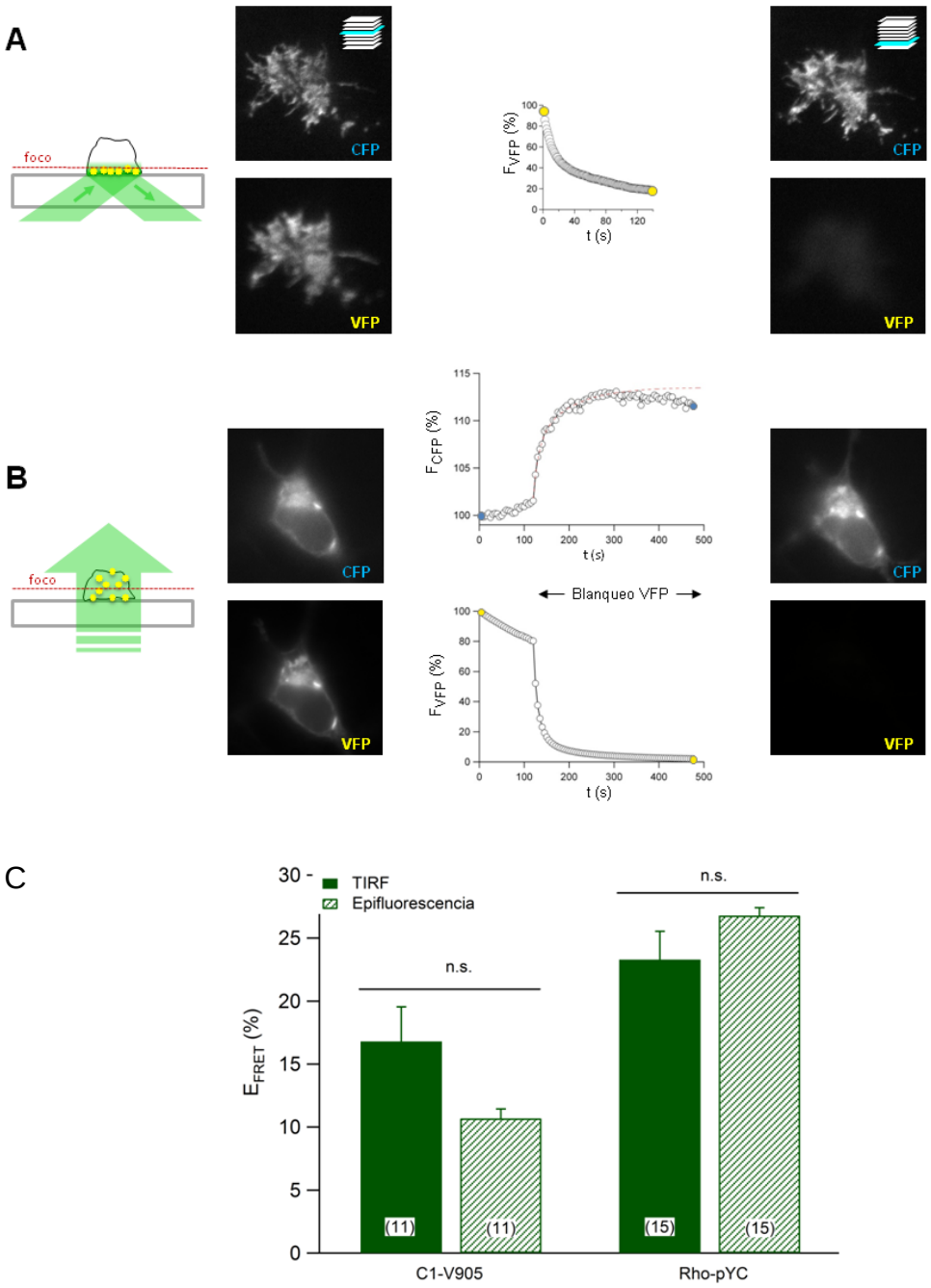


Figura 14. *Comparación del nivel de FRET bajo condiciones de TIRF y de epifluorescencia en la misma célula. Las imágenes corresponden a células HEK293 transfectadas con la construcción de hERG C1-V905. A) Resultados obtenidos en condiciones de TIRF fotoblanqueando únicamente con el láser de 514 nm. B) Resultados en la misma célula representada en A, pero en condiciones de epifluorescencia y en un plano de enfoque cerca del ecuador de la célula. Las imágenes de la derecha corresponden a las señales de CFP e VFP antes del fotoblanqueo y las de la izquierda a las mismas tras el fotoblanqueo correspondiente. Entre ellas se muestra la evolución temporal de la fluorescencia de la VFP (A), o de la CFP y de la VFP (B). C). Comparación cuantitativa de los niveles de FRET obtenidos bajo condiciones de TIRF y de epifluorescencia. Se muestran los valores de FRET tanto de la construcción de hERG C1-V905 como del tándem CFP-YFP anclado a la membrana plasmática mediante la señal de anclaje de la proteína G pequeña Rho (Rho-pYC). En ambos casos la diferencia entre las dos condiciones no resultó estadísticamente significativa.*

2. ESTIMACIÓN DE LAS DISTANCIAS ENTRE FLUORÓFOROS INSERTADOS EN DIFERENTES POSICIONES DE hERG Y LA MEMBRANA PLASMÁTICA.

En el segundo objetivo de este trabajo abordamos el estudio del posicionamiento relativo de los dominios intracelulares de hERG respecto a un punto de referencia fijo como es la membrana plasmática. Para intentar definir la distancia existente entre distintos residuos del canal hERG etiquetados y la membrana, y por tanto para poder conocer la orientación relativa de las estructuras citoplásmicas respecto a la misma, recurrimos al estudio del FRET entre dichos residuos y un fluoróforo localizado de en la membrana plasmática. Como donador FRET, usamos la YFP (o la VFP) insertada en diferentes posiciones de hERG, y como aceptor localizado en la membrana plasmática utilizamos el colorante fluorescente $DiBAC_4(5)$ (un oxonol que se inserta en la matriz lipídica de la membrana y cuyo espectro de excitación permite que sea usado como aceptor de FRET de la Y/VFP) o el colorante no fluorescente DPA que también se inserta entre los lípidos de la membrana y que debido a sus propiedades espectrales funciona como aceptor de FRET tanto de la CFP como de la Y/VFP. Una característica importante de ambos es su capacidad de traslocarse en la bicapa en respuesta al potencial de membrana. Esto puede resultar muy útil, ya que al variar la distribución de éste a ambos lados de la membrana al alterar el potencial transmembranal, se puede acercar o alejar del donador, aumentando o disminuyendo el nivel de FRET con las construcciones de hERG localizadas en la membrana.

2.1 Mecanismos de atenuación mediante FRET de la señal de un donador (YFP) por el aceptor $DiBAC_4(5)$ o DPA.

En la Figura 15 se muestra un esquema del comportamiento del $DiBAC_4(5)$ y de la DPA, al ser añadidos a las células y de su relación con un donador como la YFP. Se indica en cada caso como el colorante se inserta en la hemicapa externa de la membrana plasmática donde aumenta su fluorescencia y desde donde puede atenuar por FRET la fluorescencia de moléculas de YFP cercanas. Una vez allí, se puede producir dos tipos de respuesta a los cambios de voltaje transmembranal: una rápida y una lenta.

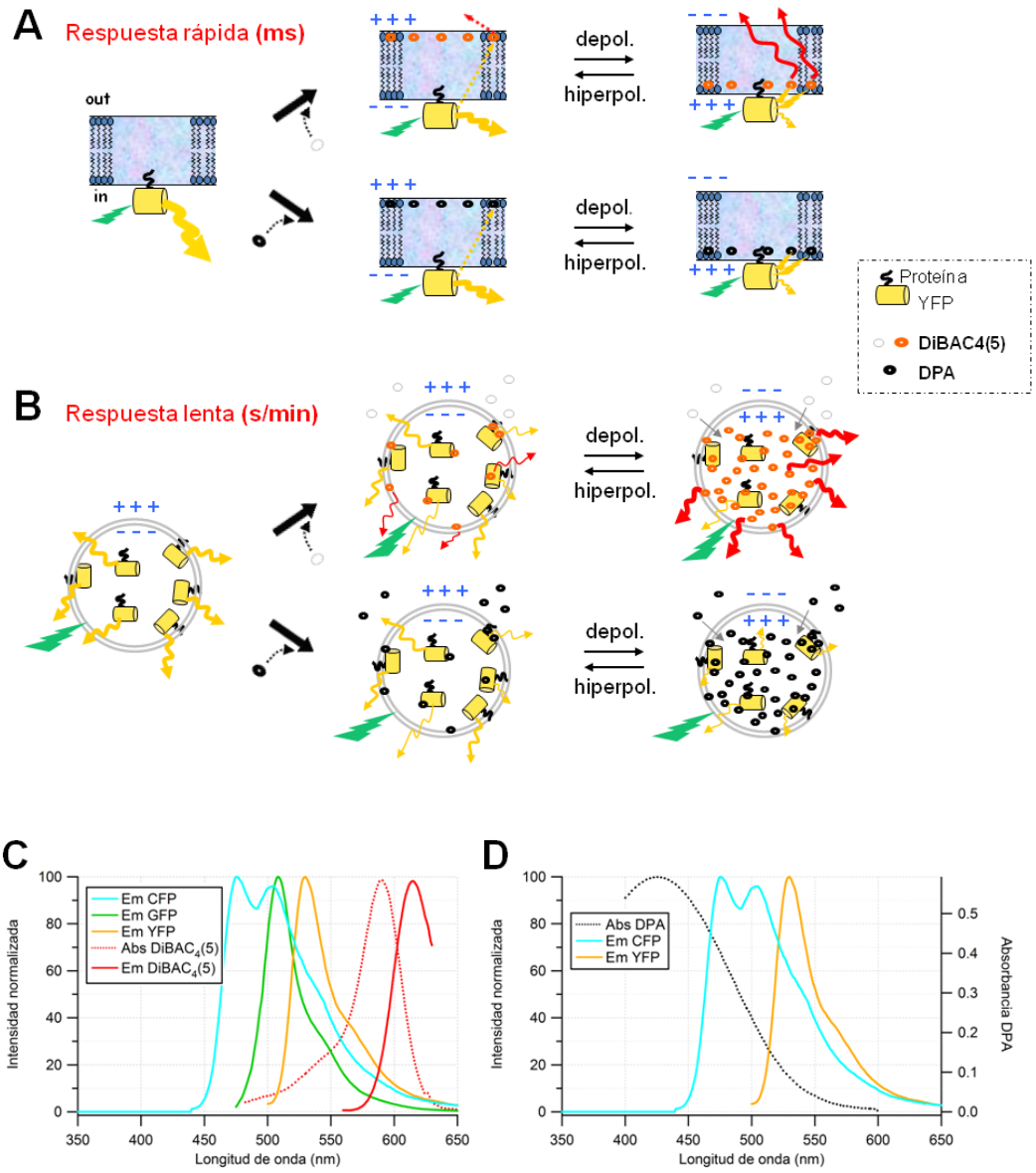


Figura 15. *Mecanismos implicados en la atenuación mediante FRET de la señal de fluorescencia de la YFP (actuando como donador) por parte del colorante DiBAC$_4$(5) o DPA actuando como aceptor. A) Representación esquemática de la respuesta rápida que ocurre en milisegundos. El DiBAC$_4$(5), que en solución acuosa mostrará poca fluorescencia (círculo blanco), o la DPA (círculo negro) al ser añadido al medio de perfusión se repartirán preferentemente en la hemicapa externa (aumentando el DiBAC$_4$(5) su fluorescencia, círculo rojo) cuando la célula se encuentra en su potencial de reposo (negativo en el interior) y atenuarán por FRET una pequeña parte de la fluorescencia de la YFP. Al despolarizar la membrana, el colorante migrará repartiéndose preferentemente en al hemicapa interna, localizándose más cerca del donador y atenuando más la fluorescencia de éste. B) Resupuesta lenta incluyendo la titulación potenciométrica del DiBAC$_4$(5) o la DPA y que ocurre en minutos. Cuando la célula se encuentra en su potencial de reposo, tras la adición del DiBAC$_4$(5) o la DPA, estos se encontrarán preferentemente en la hemicapa externa al igual que en el caso anterior, estando la fluorescencia del donador (YFP) poco atenuada. Cuando la célula es despolarizada, el DiBAC$_4$(5) o la DPA no solo penetrarán a la hemicapa interna, sino también y muy lentamente al citoplasma. Así, aumentará su proximidad no solo a las moléculas de YFP en la membrana plasmática haciendo que se atenúe por FRET la emisión de fluorescencia de éstas, sino también a las moléculas de donador localizadas en otros compartimentos celulares. C) Solapamiento espectral entre el espectro de absorción del DiBAC$_4$(5) (trazo rojo punteado) y los espectros de emisión normalizados de CFP (trazo azul), GFP (trazo verde) e YFP (trazo amarillo). El trazo rojo contínuo representa la emisión del DiBAC$_4$(5). D) Solapamiento espectral entre el espectro de absorción de la DPA (trazo negro punteado) y los espectros de emisión normalizados de CFP (trazo azul) e YFP (trazo amarillo).*

La respuesta rápida, que tiene lugar en milisegundos, consiste en una variación del reparto del colorante entre ambas monocapas de la membrana plasmática en función del potencial de membrana. Cuando la célula se encuentra hiperpolarizada y debido a su carga negativa, el colorante se localizará preferentemente en la hemicapa externa. Por el contrario, cuando la célula está despolarizada, el $DiBAC_4(5)$ o la DPA se encontrarán más fácilmente en la hemicapa interna, disminuyendo la distancia con las moléculas de YFP ancladas a la membrana y por tanto aumentando el FRET con éstas (Figura 15A). Este movimiento entre ambas monocapas resulta idóneo para analizar el FRET exclusivamente con las proteínas localizadas en la membrana plasmática.

Por otra parte, la respuesta lenta ocurre en segundos o minutos e incluye la entrada del colorante en el citoplasma cuando la membrana plasmática se despolariza, su subsiguiente unión a proteínas o estructuras hidrofóbicas y el aumento de su emisión de fluorescencia. Es por ello que en este caso se podrían titular no sólo los canales hERG expresados en superficie de membrana, sino también aquellos que se encuentren en otros compartimentos celulares (Figura 15B).

2.2 Efecto del $DiBAC_4(5)$ sobre la fluorescencia de la YFP.

Para determinar la magnitud del FRET entre el colorante $DiBAC_4(5)$ y la YFP insertada en distintas posiciones de los dominios intracelulares de hERG, se estudió el curso temporal de la disminución de la fluorescencia del donador (YFP) tras la adición de $DiBAC_4(5)$ 10 µM al medio de perfusión. Además, como control de la especificidad de FRET entre ambos para excluir que la atenuación de la fluorescencia de YFP se deba a algún efecto inespecífico de FRET, tras 10 minutos de perfusión con el $DiBAC_4(5)$ se despolarizó la membrana mediante la adición de KCl 140 mM al medio extracelular, acercando así el colorante a la YFP. Esta adición de KCl tendería a igualar la concentración de K^+ a ambos lados de la membrana haciendo que el potencial de membrana de las células HEK293 (tanto transfectadas como sin transfectar); y que tiene valores típicos entre -60 y -40 mV, alcance un valor aproximadamente nulo (Figura 16). Es interesante comentar que aunque rutinariamente utilizamos células HEK293 en estos experimentos, en ciertos casos utilizamos también células CHO. Aunque se ha indicado que éstas carecen de potencial de membrana basal (Staruschenko, *et al*. 2006), observamos que, bajo nuestras condiciones experimentales de parche perforado, una fracción sustancial de las células de esta línea muestra valores de potencial de membrana basal de alrededor de -40 mV (datos no mostrados). Evidentemente, en todos las casos dicho potencial se situó en un valor

cercano a 0 mV al eliminar el gradiente electroquímico de potasio a través de la membrana mediante la adición de KCl 140 mM al medio externo. Asimismo, al volver a perfundir a las células con un medio bajo en K^+ se recuperó el potencial de reposo de la célula, lo cual supone el consiguiente alejamiento de donador y aceptor.

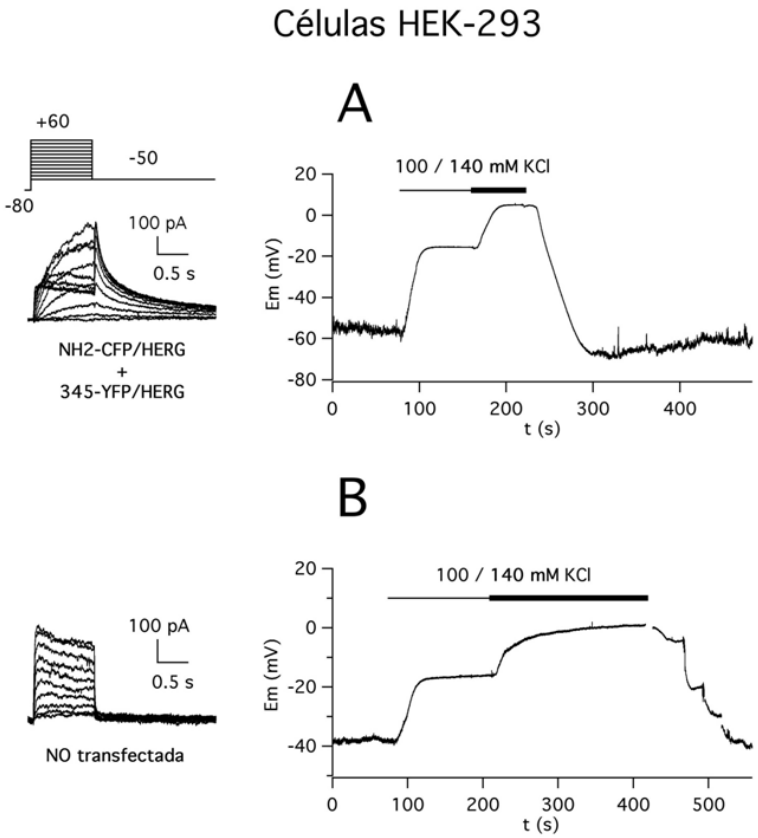


Figura 16. *Efecto de la adición de KCl al medio extracelular sobre el potencial de membrana de las células HEK293. A) Evolución temporal del potencial de membrana en una célula mantenida en "clamp" de corriente y transfectada con el canal hERG doblemente etiquetado con CFP en su extremo amino y VFP en el residuo 345. La adición de 100 y 140 mM KCl se indica mediante las líneas horizontales fina y gruesa respectivamente. B) Evolución del potencial de membrana en una célula no transfectada. Los datos fueron obtenidos en las mismas condiciones indicadas en el apartado A. A la izquierda se muestran las corrientes obtenidas en condiciones de "clamp" de voltaje tanto en las células transfectadas con el canal hERG doble etiquetado como con las células sin transfectar y tras la aplicación del protocolo ilustrado en la parte superior izquierda. Nótese la presencia de corrientes típicas de hERG en el primer caso y de pequeñas corrientes endógenas tan sólo durante los pulsos de despolarización en algunas células sin transfectar.*

A continuación, estudiamos los efectos del $DiBAC_4(5)$ sobre la fluorescencia de la YFP fusionada al extremo amino de hERG. Los resultados de un experimento representativo se muestran en la Figura 17. Se observa que a los 2 minutos de la adición del colorante, una parte de la fluorescencia del donador se ha reducido, presumiblmente por FRET (DiFranco *et al*. 2007), continuando la caída de la fluorescencia a lo largo de unos 10 minutos hasta estabilizarse. La subsiguiente despolarización de la membrana plasmática por la adición de KCl

140 mM produce a los pocos minutos un descenso adicional de la fluorescencia de la YFP. Finalmente, al repolarizar la membrana tras perfundir de nuevo las células con un medio bajo en potasio, se consigue que vuelva a aumentar la fluorescencia de la YFP hasta los niveles previos a la adición de KCl 140 mM.

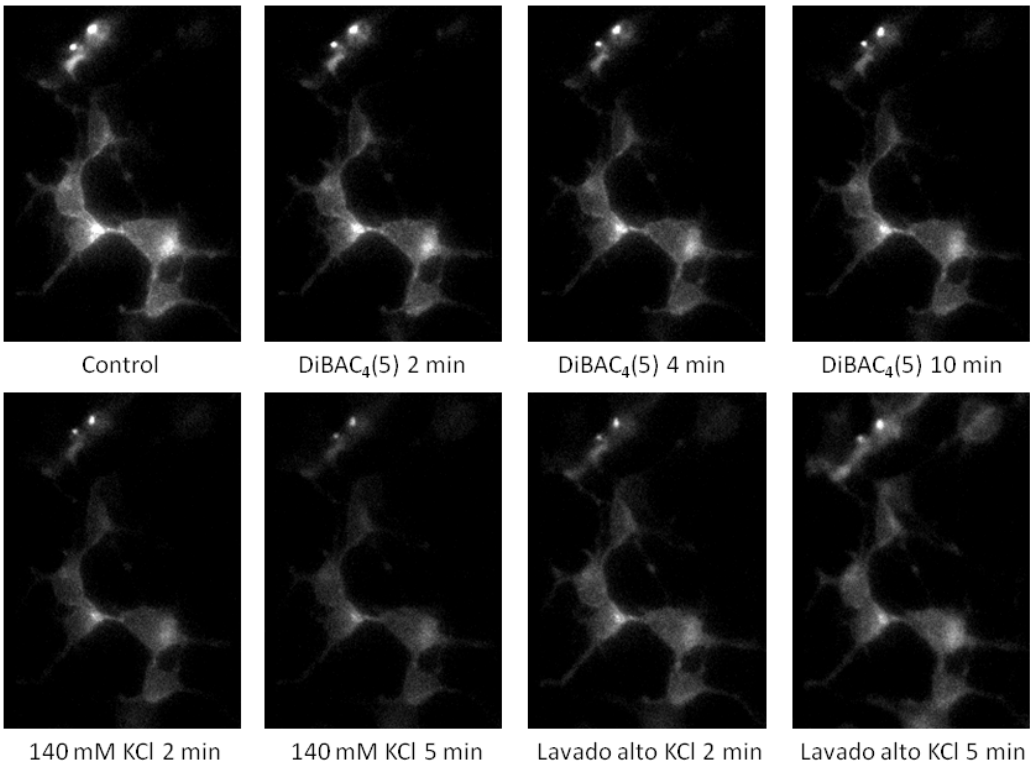


Figura 17. *Evolución temporal de la fluorescencia de YFP en presencia de DiBAC$_4$(5). Se ilustra un ejemplo en el que se utilizaron células HEK293 transfectadas con un canal hERG portando YFP en su extremo amino. Cada una de las imágenes corresponde a la fluorescencia de la YFP registrada tras su excitación a 514 nm bajo condiciones de epifluorescencia. Las imágenes fueron tomadas cada 30 segundos, pero se muestran las correspondientes al comienzo del experimento y a los 2, 4 y 10 min tras la adición de 10 µM de DiBAC$_4$(5), a los 2 y a los 5 min de la adición de 140 mM KCl a la solución extracelular y, por último a los 2 y 5 min de volver al medio extracelular bajo en potasio. El medio de perfusión con 10 µM de DiBAC$_4$(5) se preparó justo antes de su uso a partir de un stock de colorante 10 mM en DMSO preservado de la luz y mantenido a -20ºC. El colorante se mantuvo de forma continua en el medio de perfusión durante todo el experimento.*

En la Figura 18 se muestra el curso temporal de la evolución de la fluorescencia de la YFP tras la adición de DiBAC$_4$(5), obtenidos a partir de las imágenes tomadas en experimentos como el descrito anteriormente. Las gráficas corresponden a células transfectadas con cuatro construcciones distintas tal como se indica en cada una de ellas. Se han utilizado dos construcciones de hERG, una con la YFP en el extremo amino y con la cual de acuerdo con nuestros datos anteriores (Miranda *et al.* 2008*)*, se esperaría una gran proximidad de la

proteína fluorescente a la membrana plasmática, y por tanto un elevado nivel de FRET con el colorante. La otra construcción de hERG porta la variante venus de la YPF (VFP) en el extremo carboxilo. En este caso, en base a nuestros datos previos, se esperaría una mayor distancia de la VFP a la membrana plasmática. Como control positivo se ha utilizado asimismo Rho-pYC, cuya YFP se encuentra anclada a la membrana plasmática, por lo que se esperaría un valor máximo de FRET con el $DiBAC_4(5)$. Por último, como control negativo se ha utilizado YFP soluble, que al encontrarse dispersa en el citoplasma y no asociada a membranas, no se esperaría que mostrase un nivel de FRET significativo con el $DiBAC_4(5)$.

Se puede comprobar que en el caso del canal hERG etiquetado en su extremo amino, tras la adición del colorante la fluorescencia de la YFP cae alrededor de un 30% a lo largo de 10 minutos hasta estabilizarse. Por su parte, en el caso de hERG etiquetado en el carboxilo, la fluorescencia de la YFP apenas bajó un 10%. Estos datos serían coherentes con el hecho de que el extremo amino estuviese mucho más próximo a la membrana que el carboxilo. Esta interpretación estaría apoyada por los datos obtenidos con los controles. Así, en el caso del Rho-pYC en el que se espera un nivel máximo de FRET, se observa una caída de la fluorescencia de la YFP del 40%. Por su parte, en el caso de la YFP soluble, la disminución de la fluorescencia es mínima y probablemente debida al fotoblanqueo causado por su excitación a lo largo del experimento.

Por otro lado, en los casos en que la adición del $DiBAC_4(5)$ causa un efecto más notable sobre la fluorescencia de la YFP, la despolarización de la membrana celular por la adición de KCl 140 mM produce una disminución de la fluorescencia adicional (hasta un 10% en el caso de la YFP unida al extremo amino de hERG). Esta disminución es además reversible tras volver a reponer el medio bajo en potasio. Este fenómeno indica que el efecto del $DiBAC_4(5)$ sobre la fluorescencia de la YFP es debido específicamente a FRET, dependiendo exclusivamente de la distancia entre ambos, y que no se debe por ejemplo a una alteración inespecífica de la estructura del fluoróforo, en cuyo caso se esperaría que la variación de la fluorescencia fuese irreversible.

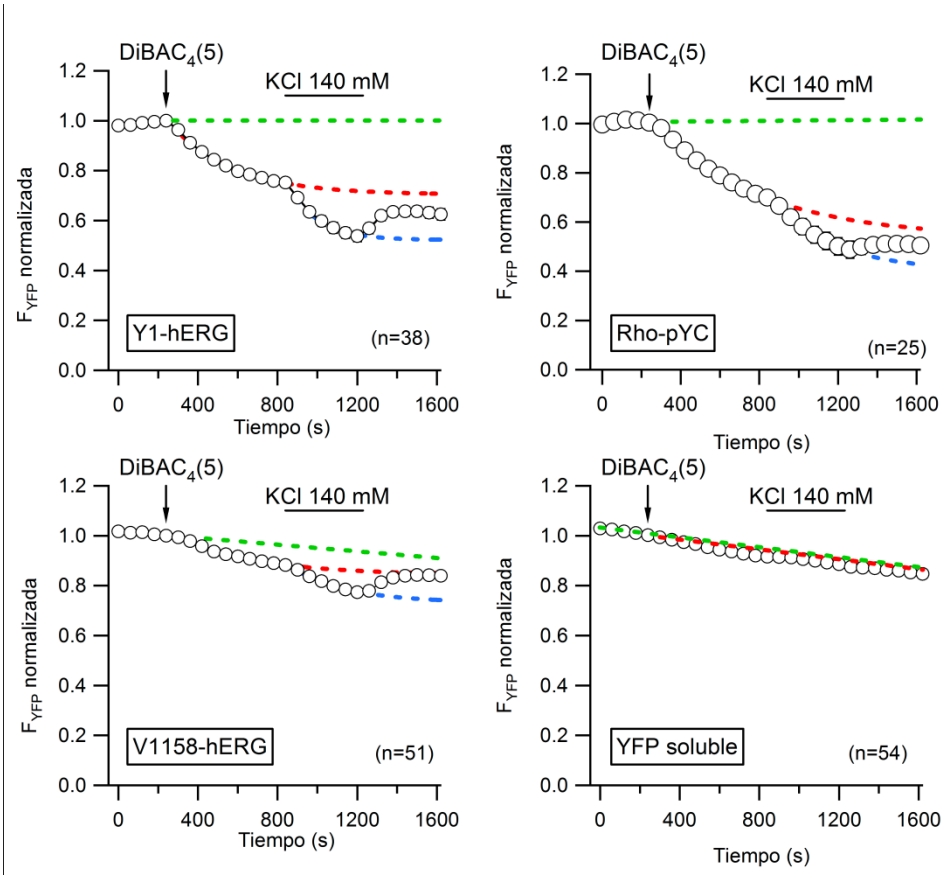


Figura 18. *Efecto del DiBAC$_4$(5) y del KCl extracelular sobre la fluorescencia de la YFP. Las células fueron transfectadas con la construcción indicada en cada gráfica. Las flechas señalan el momento en el que se empieza a perfundir 10 µM DiBAC$_4$(5). Las líneas horizontales representan la duración de la perfusión con 140 mM KCl. El trazo punteado verde corresponde a la extrapolación de la progresión de la fluorescencia previa a la adición del colorante. Las líneas azul y roja fueron obtenidas mediante ajuste exponencial a los datos correspondientes al período en presencia de DiBAC$_4$(5) y DiBAC$_4$(5)+KCl respectivamente. El número de células promediadas se indica entre paréntesis en la parte inferior derecha de las gráficas. En todos los casos, la intensidad de fluorescencia fue medida en las distintas células individuales como el promedio de la señal en todos los píxeles limitados por un área de interés establecido alrededor del perímetro celular mediante el software de análisis. El número total de células comprendió a las analizadas en varios campos de varias transfecciones independientes.*

A la vista de estos datos, cabría pensar que la técnica es capaz de medir diferentes distancias entre la membrana plasmática y un donador de FRET (YFP o VFP) situado en distintas posiciones. Sin embargo, incluso aunque la despolarización de la membrana provocada por el KCl tiene lugar en unos pocos segundos (ver Figura 16), el curso temporal de la disminución de la fluorescencia resulta sumamente lento, no detectándose ninguna variación significativa en los primeros instantes. De hecho, incluso la extrapolación del ajuste exponencial al momento de las adiciones no revela ningún componente "instantáneo" como reflejo del movimiento del colorante de una hemicapa a otra. Así pues, tan sólo parece detectarse un movimiento muy lento del DiBAC$_4$(5), el cual podría corresponder a la redistribución del colorante al interior celular y no a su rápido paso entre ambas hemicapas.

Aún así, para intentar descartar que la lenta cinética de variación de la fluorescencia en respuesta a los cambios de voltaje pueda estar influenciada por cambios de potencial poco precisos y relativamente lentos tras la adición de KCl, procedimos a repetir algunos de estos experimentos en condiciones de "clamp" de voltaje y parche perforado, unas condiciones que permiten fijar el potencial de membrana con gran exactitud y cambiarlo de un modo prácticamente instantáneo. Sin embargo, de nuevo en este caso se obtuvieron unas cinéticas lentas prácticamente idénticas a las descritas tras la adición de KCl y en ningún momento una respuesta rápida (datos no mostrados). Esto indica que el lento movimiento del $DiBAC_4(5)$ no se debe a un cambio del potencial de membrana lento u a otros efectos de la adición de KCl al medio.

Como una alternativa adicional para detectar de un modo más específico el efecto del $DiBAC_4(5)$ sobre los canales hERG ensamblados y localizados exclusivamente en la membrana plasmática, recurrimos al empleo de parches de membrana escindidos mediante el uso de una pipeta de "patch". Este método permitie estudiar exclusivamente el pequeño parche de membrana unido a la punta de la pipeta y además controlar de manera instantánea el potencial de membrana del parche. No obstante, añade una serie de complicaciones técnicas como la necesidad de tener un alto nivel de expresión para disponer de niveles suficientes de fluorescencia y la de utilizar tiempos de excitación largos que agravan los problemas de blanqueo. Aún en las condiciones mas óptimas, de nuevo observamos que el efecto del $DiBAC_4(5)$ sobre la fluorescencia de la YFP insertada en el extremo amino de hERG sigue siendo muy lento (Figura 19). Además, obtuvimos resultados equivalentes tanto usando parches perforados a derechas ("outside-out") como al revés ("inside-out") a fin de intentar minimizar la posible contaminación de los mismos con restos celulares. La única diferencia observada respecto a los experimentos realizados en células completas fue el nivel de la atenuación de la fluorescencia de la YFP que resultó ser algo mayor. Es probable que esto sea debido a que se está valorando selectivamente la señal de fluorescencia procedente de los fluoróforos presentes en las membranas de los parches escindidos, si bien la posibilidad de que aún permanezcan unidas ciertas estructuras membranosas intracelulares no puede ser descartada totalmente.

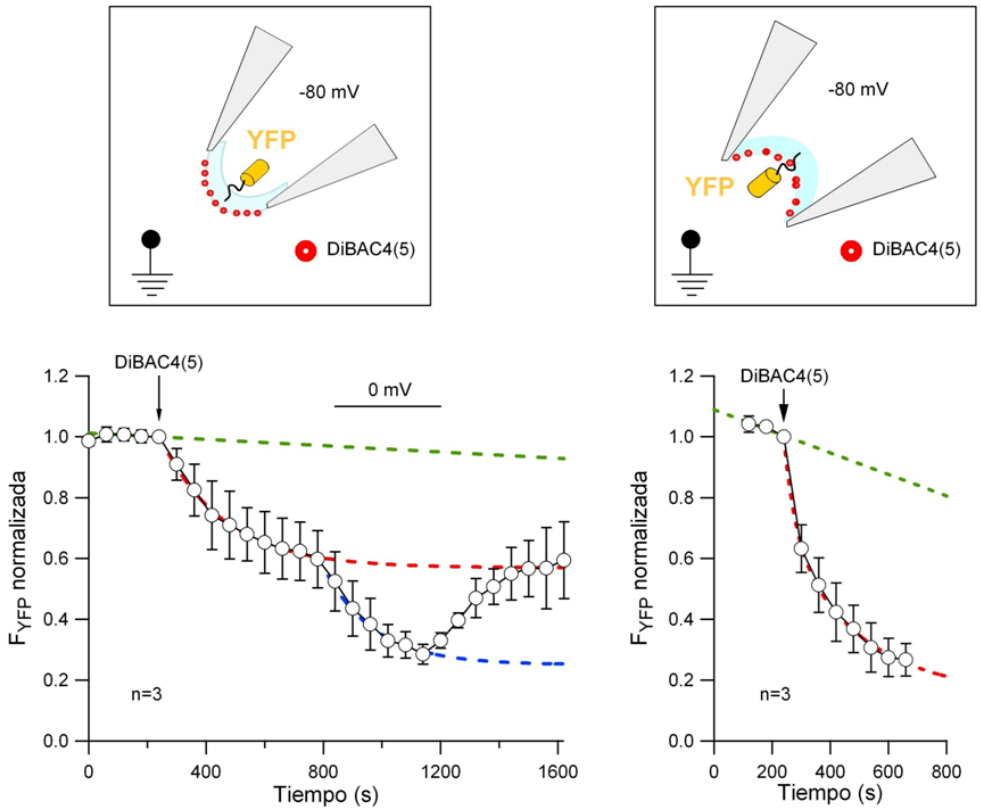


Figura 19. *Efecto del DiBAC$_4$(5) sobre la fluorescencia de la YFP en parches de membrana escindidos en la punta de una pipeta de "patch-clamp". Los parches de membrana fueron escindidos de células HEK293 expresando canales hERG etiquetados con YFP en el extremo amino, tanto en orientación "a derechas" (izquierda) como "al revés" (derecha) según se indica en los esquemas superiores. En ambos casos el potencial de la pipeta se fijó en un valor inicial de -80 mV. La presentación de los datos en las gráficas es idéntica a lo indicado en la leyenda de la Figura 18.*

Finalmente, señalar que, también nos planteamos el estudio del efecto del DiBAC$_4$(5) en condiciones de TIRF. Sin embargo, de nuevo no se consiguió ninguna ventaja respecto a los experimentos en epifluorescencia, ya que la adición del colorante produce una atenuación de la fluorescencia del donador (YFP) de forma igualmente lenta, tanto antes como después de la despolarización con altas concentraciones de KCl (datos no mostrados).

2.3 Posible contribución de la titulación potenciométrica del DiBAC$_4$(5) a la atenuación de la fluorescencia de la YFP.

El hecho de que todas las variaciones de fluorescencia observadas ocurran de un modo tan lento, nos hizo plantearnos si esta lenta cinética podría ser debida a una mera distribución potenciométrica del colorante hacia el interior celular. Esta circunstancia dificultaría la interpretación de los datos de variación de fluorescencia en canales tipo hERG, ya que estos se distribuyen por todo el interior de la célula (Miranda *et al*. 2008; ver también la Figura 26). A fin de dilucidar si en respuesta a los cambios de voltaje el colorante sigue una respuesta

potenciométrica lenta que se corresponda con su capacidad para atenuar las señales fluorimétricas, estudiamos la evolución de la fluorescencia en respuesta al voltaje en células mantenidas en "clamp" de voltaje en la configuración de "parche perforado". En este caso seguimos simultáneamente la fluorescencia del propio $DiBAC_4(5)$ y la de su donador de FRET, para estos experimentos la GFP con una señal de farnesilación que la ancla directamente a la membrana plasmática. El hecho de usar GFP en lugar de YFP se debe a la inexistencia en el mercado de un juego de espejos dicroicos y filtros de doble banda capaz de separar eficientemente las señales de YFP y $DiBAC_4(5)$. Debe tenerse en cuenta que debido al menor solapamiento espectral de la GFP con el $DiBAC_4(5)$ en comparación con la YFP, en estos experimentos se espera un rendimiento de FRET bastante menor. En la Figura 20 se muestran los resultados correspondientes a un experimento representativo. Se puede observar que la fluorescencia del $DiBAC_4(5)$ asociada a la célula aumenta notablemente cuando la membrana plasmática se fija a potenciales más positivos, haciendo que el colorante se reparta mayoritariamente al interior celular. Por otro lado, cuando el potencial de membrana de la célula se fija a voltajes más negativos, la fluorescencia del colorante será menor, previsiblemente debido a su preferente localización en el exterior celular. Además al igual que ocurría en el caso de la despolarización por la adición de KCl 140 mM, la variación de fluorescencia ocasionada por el reparto del colorante es considerablemente lento (minutos). En cuanto a la fluorescencia de la GFP farnesilada, podemos ver variaciones que coinciden en el tiempo con las del $DiBAC_4(5)$ pero en sentido contrario, disminuyendo cuando el potencial transmembranal es más positivo en el interior y aumentando cuando es más negativo. Dado que la GFP farnesilada se expresa en la membrana plasmática y a que es insensible a los cambios de voltaje, estas observaciones indican que el FRET entre la GFP y el colorante se está detectando no sólo cuando el colorante se redistribuye en las hemicapas de la membrana plasmática, sino también cuando es titulado potenciométricamente fuera y dentro de la célula.

En el panel B de la Figura 20 se muestra la relación existente entre la variación de la fluorescencia del $DiBAC_4(5)$ y el potencial de membrana aplicado. Se puede observar que los datos pueden ajustarse a una función sigmoidea que indica que el colorante estaría igualmente repartido a ambos lados de la membrana a un potencial de en torno a los -26 mV. Este valor resulta similar al obtenido previamente por otros autores (-31 mV; Yamada et *al*. 2001) respecto a la titulación potenciométrica del $DiBAC_4(5)$ en las mismas condiciones. También puede apreciarse que la atenuación de la fluorescencia de la GFP sigue una pauta equivalente a la de la fluorescencia del propio $DiBAC_4(5)$ respecto al valor del potencial de membrana.

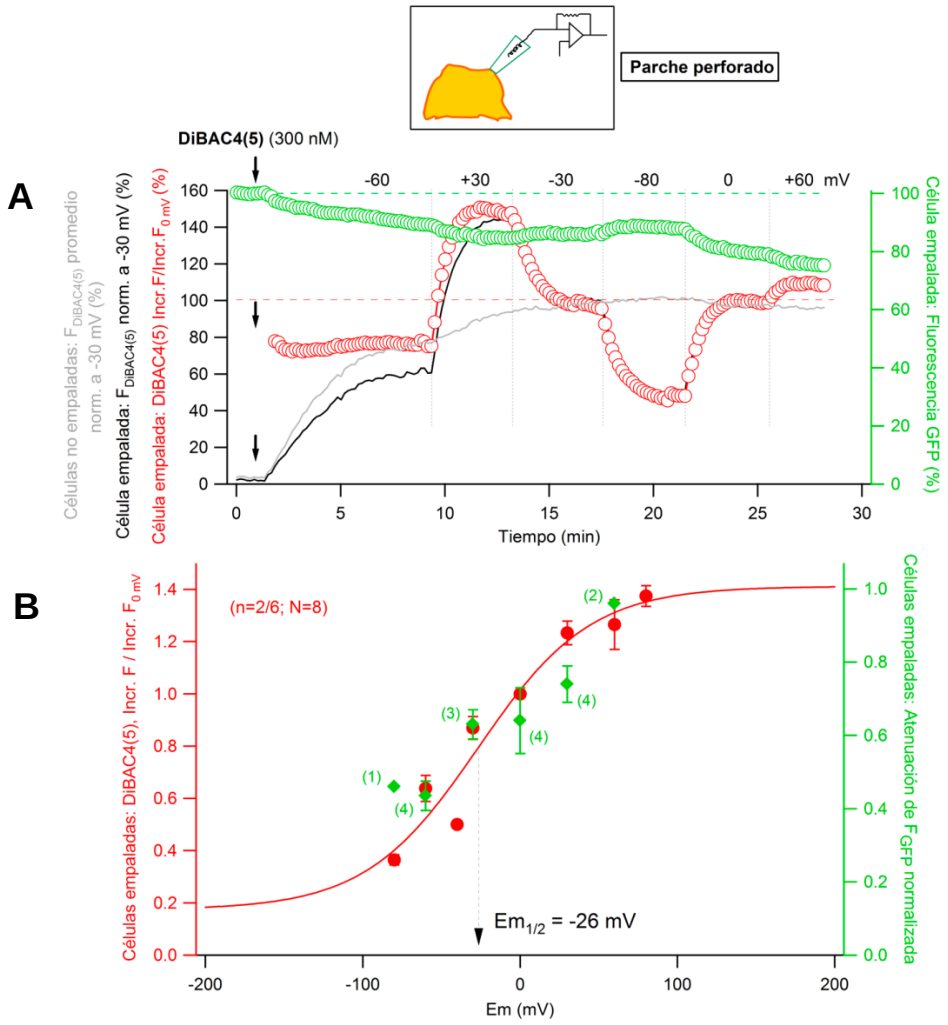


Figura 20. *Correspondencia entre la titulación potenciométrica del DiBAC$_4$(5) en respuesta a las variaciones del potencial de membrana y la atenuación por dicho colorante de la fluorescencia de la GFP farnesilada. A) Evolución de la fluorescencia de los dos fluoróforos en una célula HEK293 transfectada con GFP farnesilada y sometida a "clamp" de voltaje en condiciones de parche perforado. Las flechas señalan el momento de la adición de 10 µM DiBAC$_4$(5) al medio de perfusión. Las líneas contínuas negra y gris representan respectivamente la evolución de la fluorescencia en la célula empalada y en la media del resto de las células del campo cuyo potencial de membrana no es controlado a lo largo del experimento. Los círculos rojos corresponden al cambio de fluorescencia relativa del DiBAC$_4$(5) en la célula empalada respecto al observado en las restantes células del mismo campo. Los círculos verdes corresponden a la variación de la fluorescencia de la GFP farnesilada en la misma célula. B) Relación entre la dependencia de voltaje de la fluorescencia del DiBAC$_4$(5) y la de la atenuación de la fluorescencia de la GFP farnesilada.*

Dado que estos datos han sido obtenidos con una proteína localizada en la membrana plasmática, parece que pese a que la respuesta del colorante se esté produciendo de forma lenta, quizá sería posible utilizar la atenuación por el DiBAC$_4$(5) de la fluorescencia de un donador como la YFP para estimar al menos cualitativamente, la distancia de esta proteína fluorescente al colorante, y por tanto a la membrana. Sin embargo, la ausencia de una respuesta rápida en todas las aproximaciones técnicas empleadas y el hecho de que en el caso de una proteína como hERG con una marcada distribución intracelular no sea posible conocer en que medida contribuyen a los resultados los fluoróforos no asociados a la membrana

plasmática, nos llevó a buscar otro aceptor de FRET que también se moviese entre ambas hemicapas ante los cambios del voltaje transmembranal, pero que permitiese evitar o al menos minimizar estos inconvenientes.

2.4 Efecto de la DPA sobre la fluorescencia de una molécula de GFP anclada a la membrana plasmática.

El primer paso en el establecimiento de la DPA como una alternativa al $DiBAC_4(5)$, consistió en comprobar si con este colorante era posible detectar bajo nuestras condiciones técnicas su movimiento rápido en respuesta a los cambios de voltaje en la membrana plasmática.

Para ello como control utilizamos como aceptor de FRET la GFP anclada a la membrana mediante un grupo farnesilo (Figura 21A). Esta construcción, además de presentar un elevado grado de solapamiento espectral con el DPA (DiFranco *et al*. 2007), se expresará de manera casi exclusiva en la membrana plasmática, de modo que la variación de fluorescencia observada tras aplicar un pulso despolarizante debería corresponder mayoritariamente al componente rápido del movimiento de la DPA de una hemicapa a otra. Como se puede observar en la Figura 21B, la aplicación de pulsos de voltaje a una célula HEK293 mantenida a -80 mV en "clamp" en célula entera y en presencia de 20 µM de DPA, produce una variación perfectamente detectable y prácticamente instantánea de la fluorescencia de la GFP. Además, la magnitud de dicha variación depende del cambio de voltaje aplicado. Así, la disminución de la fluorescencia es mayor cuando se aplican voltajes más positivos y menor o incluso se da un pequeño aumento cuando se aplican voltajes más negativos. Estos resultados son consistentes con el hecho de que a voltajes positivos la mayoría de moléculas de DPA se encuentren en la hemicapa interna cerca de la GFP, mientras que conforme el potencial de membrana se hace más negativo, la DPA se acumulará en la hemicapa externa donde atenuará mucho menos a la GFP al estar más alejado de ella. En la Figura 21C se muestran superpuestos los trazos correspondientes a la variación de la fluorescencia de la GFP tras la aplicación de los pulsos de voltaje, una vez que dicha variación ha sido normalizada respecto a la fluorescencia basal a -80 mV. En este caso, la variación inducida por la DPA ocurre en unos pocos milisegundos, manteniéndose prácticamente estable el resto del pulso. Este resultado es consistente con el hecho de que al expresarse la GFP casi exclusivamente en la membrana plasmática, el movimiento lento de la DPA al interior de la célula no influirá sobre muchas más moléculas de GFP y, por tanto, casi no se observará un componente lento en la variación de la fluorescencia. Debe destacarse además que esta variación de la fluorescencia es completamente reversible al

volver al potencial basal, lo cual es a su vez un buen indicador de que estas variaciones en la fluorescencia son específicas de FRET y no debidas a otros efectos inespecíficos. Por otro lado, tal como se ha descrito anteriormente con otros sistemas celulares (DiFranco *et al*. 2007), la magnitud de la variación de la fluorescencia causada por la DPA es dependiente de voltaje (Figura 21D), siendo mayor la variación cuanto más positivo se hace el potencial de membrana a partir del potencial basal de -80 mV. Nótese que este caso esta dependencia de voltaje es observable tanto realizando la medida en los primeros milisegundos tras la aplicación del pulso de voltaje (círculos blancos) como al final del mismo (cruces verdes).

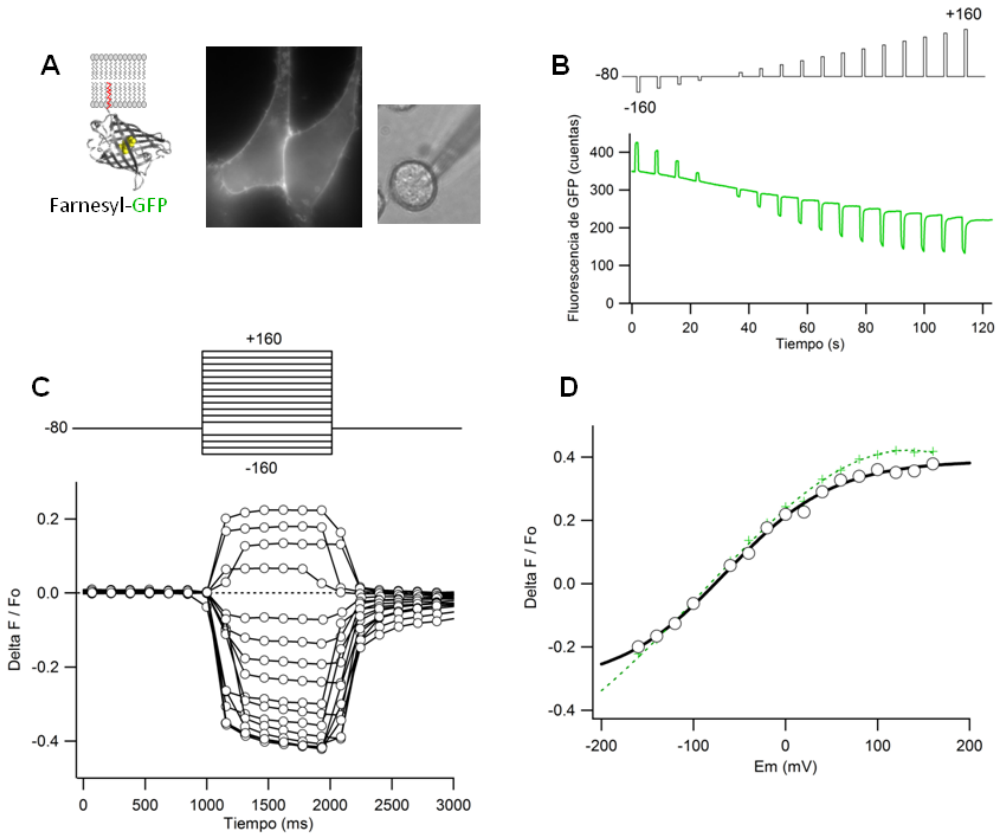


Figura 21. *Efecto de la DPA sobre la fluorescencia de la GFP farnesilada. A)Esquema representativo de la molécula de GFP unida a la membrana plasmática mediante un grupo farnesilo e imagen representativa de la distribución de la fluorescencia en la membrana plasmática. En la parte derecha se muestra una imagen en campo claro de una célula con una pipeta de patch sellada a la membrana plasmática. B) Evolución de la fluorescencia de la GFP en respuesta a los cambios de voltaje transmembranal. En la parte superior se muestra el protocolo de voltaje aplicado a la célula en "clamp" de voltaje de célula entera y en presencia de 20 µM DPA. El trazo verde corresponde a la evolución temporal de la fluorescencia de la GFP durante la aplicación de los distintos voltajes. C) Cambios en los niveles de la fluorescencia de la GFP en función del voltaje aplicado. Los trazos corresponden a la evolución de la fluorescencia en respuesta a los pulsos esquematizados en la parte superior. Los niveles de fluorescencia han sido normalizados respecto al valor registrado justo antes de la aplicación de los pulsos de voltaje D) Dependencia de voltaje de la variación de fluorescencia. El trazo negro corresponde al ajuste realizado mediante la ecuación de Blotzmann a la variación "instantánea" de la fluorescencia durante los primeros milisegundos. El verde corresponde a la variación de la fluorescencia al final del pulso de voltaje de un segundo.*

Una vez comprobado que en las células HEK293 expresando GFP farnesilada unida a la membrana plasmática es posible detectar la variación del nivel de FRET correspondiente al movimiento rápido de la DPA entre ambas hemicapas de dicha membrana, tratamos de implementar un protocolo estándar que nos permitiese obtener el máximo nivel de variación de FRET para ser utilizado con las distintas construcciones del canal hERG portando al donador en distintas posiciones. Puesto que la magnitud de la variación del nivel de FRET es dependiente de voltaje y un mayor salto de voltaje rendirá una mayor diferencia de FRET, optamos por utilizar pulsos de voltaje de 240 mV (desde -120 mV a + 120 mV), para aplicar el mayor salto de voltaje posible manteniendo estable el sello entre la pipeta de "patch" y la membrana y poder aplicar secuencialmente hasta 10 pulsos a la misma célula. Además, ya que la fluorescencia del fluoróforo va disminuyendo gradualmente por el fotoblanqueo causado por la excitación continua necesaria en este tipo de experimento, pudimos comprobar que la variación de fluorescencia inducida por la DPA ante un cambio de voltaje no es dependiente del nivel de fluorescencia inicial del donador. A modo de ejemplo, en la Figura 22 se muestra la variación de la fluorescencia normalizada y promediada utilizando 28 pulsos como los recién descritos en 3 células diferentes. Como se puede observar, las medidas resultan muy reproducibles y similares, presentando la media un error muy pequeño.

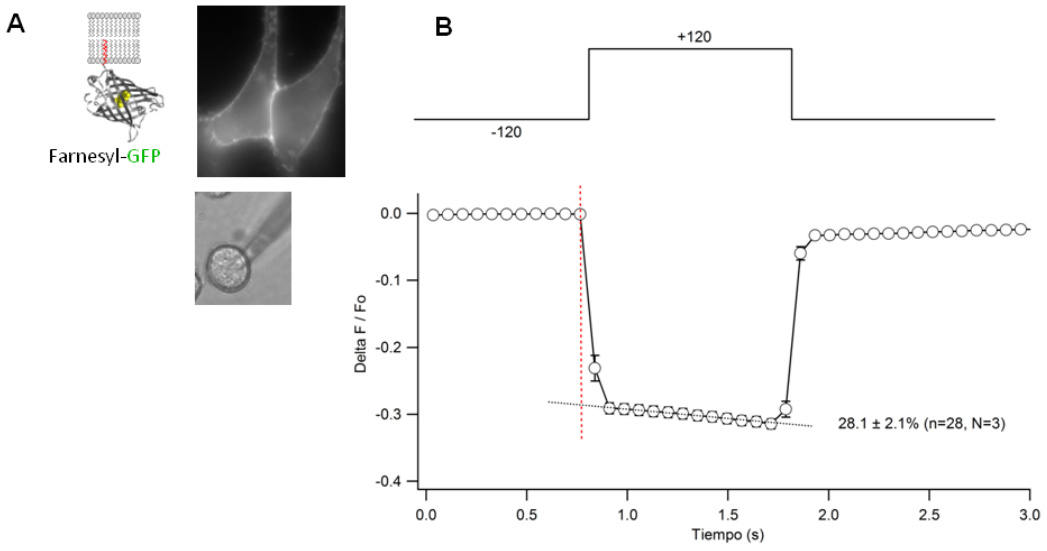


Figura 22. *Atenuación de la fluorescencia de la GFP inducida por la DPA tras un salto de voltaje de 240 mV. A) Esquema representativo de la GFP unida a la membrana plasmática mediante un grupo farnesilo e imagen representativa de la distribución de su fluorescencia restringida mayoritariamente a la membrana plasmática. En la parte inferior se muestra una imagen en campo claro de una célula con una pipeta de patch sellada a la membrana plasmática. B) Variación de fluorescencia de la GFP en respuesta a un pulso de despolarización de 1 s a +120 mV desde un potencial basal de -120 mV en condiciones de "clamp" de célula entera. La línea punteada gris corresponde al ajuste lineal de los datos durante la fase de movimiento lento de la DPA hacia el citoplasma. Su punto de corte con la línea que marca el inicio de la despolarización (línea punteada roja) indicará la disminución de la fluorescencia debida al movimiento rápido del colorante entre las dos hemicapas de la membrana, cuyo valor promedio se indica en la gráfica. n corresponde al número de pulsos de voltaje promediados y N es el número de células utilizadas.*

Para cuantificar el nivel de atenuación "instantánea" inducido por la DPA ante el pulso de despolarización (debido exclusivamente al paso del DPA de una hemicapa a otra), se realizó una extrapolación a tiempo cero respecto al inicio del pulso de voltaje (línea gris en la Figura 22). De esta forma y aunque nuestro sistema de recogida de datos presenta una respuesta lenta (ver Métodos), fue posible cuantificar la disminución de la fluorescencia en el inicio del pulso de despolarización correspondiente exclusivamente al movimiento rápido del DPA entre las dos hemicapas. Se obtuvo así un nivel de atenuación de la fluorescencia del 28.1 ± 2.1%. Debe indicarse que aunque en el caso de la GFP farnesilada el "componente lento" no influye en gran medida en la magnitud de la respuesta inicial, este tipo de extrapolación es crucial en el caso del canal hERG, cuya expresión no está ni mucho menos restringida a la membrana plasmática.

2.5 La disminución de la fluorescencia inducida por la DPA varía en función del fluoróforo utilizado como donador de FRET.

Un control adicional de que la fluorescencia emitida por el donador es reducida específicamente por FRET con el aceptor, consiste en que si dos fluróforos presentan distinto grado de solapamiento espectral con la DPA, la variación de la fluorescencia de estos cuando la DPA se acerque o aleje será distinta aún cuando la localización de ambos fluoróforos sea la misma. Así, hemos comparado los niveles de atenuación de la señal de la CFP (cuyo espectro de emisión presenta mayor solapamiento con el de absorción de la DPA) y la de la YFP (con menor solapamiento), en células HEK293 transfectadas con Rho-pYC, que al consistir en un tándem de ambos fluoróforos anclados a la membrana plasmática, permite estudiar la respuesta de ambos fluoróforos en la misma célula. Paralelamente comparamos el efecto de la concentración de la DPA sobre el nivel de FRET. Estos controles se realizaron utilizando un protocolo análogo al descrito en el apartado anterior. En este caso, se aplicó un único pulso de voltaje de 240 mV en cada una de las condiciones a comparar, registrándose la variación de la fluorescencia de la CFP e inmediatamente después la fluorescencia de la YFP tras la aplicación de un nuevo pulso, y en presencia de 5 o 20 µM de DPA (Figura 23). En este experimento se recurrió a la configuración de parche perforado, mucho más estable en el tiempo. Tal como se puede observar comparando las gráficas A y B o C y D de la Figura 23, la fluorescencia de la CFP que presenta un mayor solapamiento espectral con la DPA, es atenuada mucho más que la de la YFP, tanto en presencia de 5 (9 ± 0.5 % vs 4.4 ± 0.2%) como de 20 µM (16.8 ± 0.4% vs 12.4 ± 0.3%) DPA, siendo la atenuación mucho mayor en presencia de altas concentraciones de DPA. (Figura 23). Aunque estos resultados demuestran que la CFP es una mejor pareja de FRET para la DPA que la YFP, es importante indicar que la mayoría de nuestras construcciones de interés

del canal hERG estaban etiquetadas con YFP. Además, el nivel de fluorescencia de esta última permite registros más estables y con unos niveles de fluorescencia mas facilmente detectables. Dado que las señales eran atenuadas suficientemente como para permitir un análisis fiable, optamos por utilizar la YFP como pareja de FRET de la DPA.

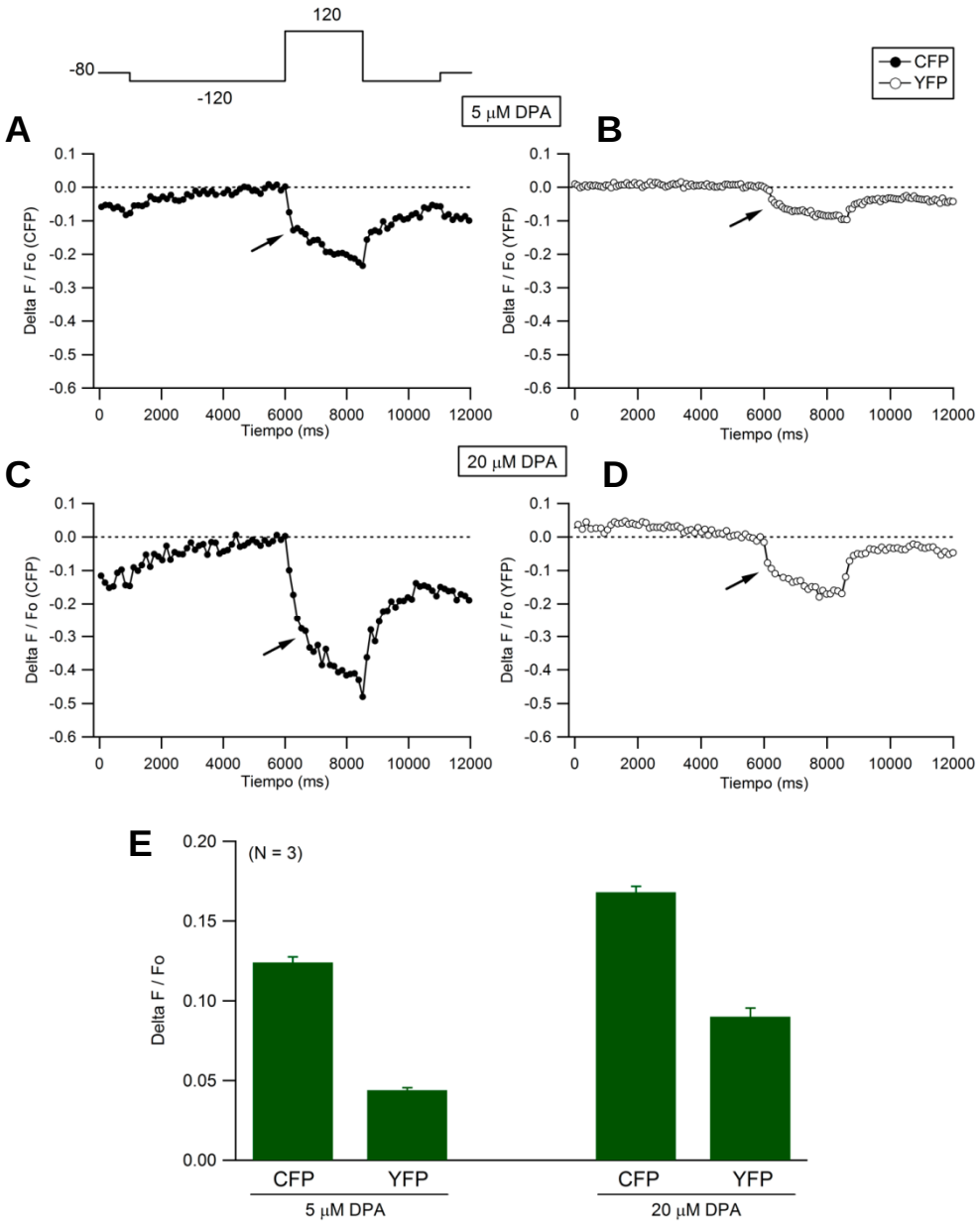


Figura 23. *Comparación de la atenuación por FRET de la fluorescencia de la CFP y la YFP por dos concentraciones de DPA. Los datos corresponden a células HEK293 transfectadas con Rho-pYC y mantenidas en "clamp" de voltaje en condiciones de parche perforado. El protocolo de voltajes aplicados se esquematiza en la parte superior. A) Variación de la fluorescencia de la CFP en presencia de 5 μM de DPA. B) Variación de la fluorescencia de la YFP en presencia de 5 μM de DPA. C) Variación de la fluorescencia de la CFP en presencia de 20 μM de DPA. D) Variación de la fluorescencia de la YFP en presencia de 20 μM de DPA. El nivel de fluorescencia "inicial" tras el cambio de voltaje es indicado con una flecha en los distintos paneles. E) Comparación de atenuación de la fluorescencia por el movimiento "instantáneo" de la DPA en respuesta al pulso de voltaje entre -120 y +120 mV. N es el número de células utilizado. Las cuatro mediciones ilustradas en A-D se realizaron secuencialmente en la misma célula.*

2.6 Efecto de la DPA sobre la fluorescencia de la YFP insertada en distintas posiciones del canal hERG.

Un primer inconveniente que fue necesario sortear al comparar los niveles de atenuación por FRET de la señal de la proteína fluorescente unida a distintos residuos del canal hERG, es que en el caso de la YFP (y especialmente en el de su variante VFP utilizada en la mayoría de las construcciones del canal hERG), la estimulación continua del fluoróforo que tiene lugar durante la aplicación de los pulsos de voltaje produce un considerable fotoblanqueamiento del mismo, lo que dificulta el establecimiento de un nivel inicial de fluorescencia respecto al cual calcular la variación de ésta tras la despolarización (Figura 24A). Para solucionarlo, se realizó un ajuste exponencial al registro de fluorescencia utilizando solamente los puntos correspondientes a los intervalos entre los pulsos con la célula mantenida a un potencial de -120 mV. La curva resultante (línea roja en el Figura 24A) corresponde a la evolución de la fluorescencia de la YFP por blanqueo . Tras restar punto a punto esta nueva curva a la curva original y normalizar la fluorescencia, se obtiene una nueva gráfica (Figura 24B) que corresponde a las diferencias de fluorescencia al aplicar los pulsos de voltaje respecto de la fluorescencia al potencial de membrana basal al que se ha fijado la célula (-120 mV). Tal como se ve en la figura, la atenuación inducida por la DPA es la misma en todos los pulsos, independientemente del nivel de fluorescencia inicial. Asimismo, esta nueva curva indica que el espacio de tiempo entre pulso y pulso de voltaje es el adecuado ya que, tras terminar el pulso, la atenuación es revertida completamente antes del siguiente cambio de potencial.

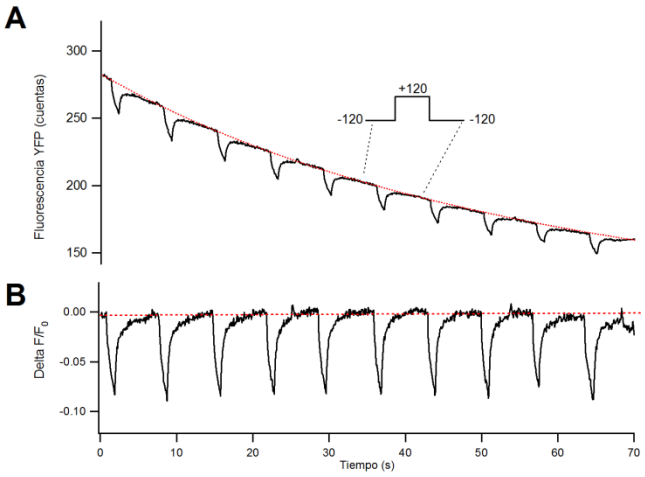


Figura 24. *Variación de la fluorescencia de la YFP unida al canal hERG en su extremo amino inducida por la DPA en respuesta a los cambios de voltaje. A) Curso temporal de la fluorescencia de la YFP de una célula HEK293 transfectada con hERG-Y1 y mantenida a un potencial basal de -120 mV en condiciones de "clamp" de voltaje de célula entera. La membrana fue sometida a los pulsos de voltaje de 240 mV indicados y en presencia de 20 µM de DPA. La línea roja corresponde al ajuste exponencial sobre la parte del registro correspondiente a -120 mV y que representaría la evolución de la fluorescencia debida exclusivamente al blanqueo del fluoróforo. B) El mismo registro una vez normalizado respecto a la fluorescencia base a -120 mV.*

En la Figura 25 se recoge el promedio de 73 de estas variaciones de la fluorescencia del canal hERG con YFP insertada en el extremo amino (hERG-Y1) inducidas por la DPA al aplicar los pulsos de voltaje en 9 células diferentes. Nótese que en este caso la atenuación de la fluorescencia no sigue la misma cinética que en el caso de proteínas expresadas en la membrana como la GFP farnesilada o el Rho-pYC. Así, en lugar de un efecto prácticamente instantáneo seguido de una variación ulterior muy leve, se observa una caída lenta y exponencial. La lenta evolución de la señal es debida probablemente a que en el caso de hERG, la proteína se localiza por toda la célula y no solo en la membrana plasmática (ver Figura 26) y a que una parte importante de la fluorescencia recogida corresponde a canales localizados en el interior de la célula. Consecuentemente, la atenuación inducida por la DPA estará muy influida por el movimiento lento del colorante hacia el citoplasma. Esto nos obligó a utilizar una estrategia como la ya mencionada anteriormente para poder separar los componentes rápido y lento del movimiento de la DPA mediante extrapolación del componente lento al momento de la aplicación del cambio de voltaje. Como se muestra en la Figura 25, la extrapolación de dicho componente lento (línea discontinua roja) al momento inicial del pulso de voltaje (señalada por la flecha roja), sitúa la atenuación "instantánea" en un valor de 2.6 ±0.5% para el caso de 20 µM DPA. Para una concentración de DPA 5 µM, que se muestra como comparación, la bajada de la fluorescencia es demasiado reducida, dificultando la cuantificación del componente rápido que en este caso se situaría en un valor en torno al 0.4%.

En este tipo de experimentos se adoptó 1 s como la duración óptima para cada pulso, teniendo en cuenta la acumulación excesiva de colorante en el interior celular, la inestabilidad del sello con la pipeta de "patch" y el fotoblanqueamiento de la Y/VFP que ocurren con pulsos más largos.

Es importante considerar en este punto una limitación del sistema. Mientras la fluorescencia detectada proviene de toda la célula, el movimiento rápido de la DPA solo acercará el colorante a los fluoróforos de la membrana plasmáticay solo se dará FRET con los fluoróforos localizados en la misma, por lo que la atenuación de la fluorescencia estará infravalorada. Esto dificulta la estimación cuantitativa de la distancias entre los dos componentes de la pareja de FRET. Sin embargo, asumiendo que todas las construcciones del canal hERG presentan una distribución subcelular similar, este sistema sí que permitirá comparar las distancias relativas a la membrana de los distintos residuos del canal hERG en los que se insertan fluoróforos.

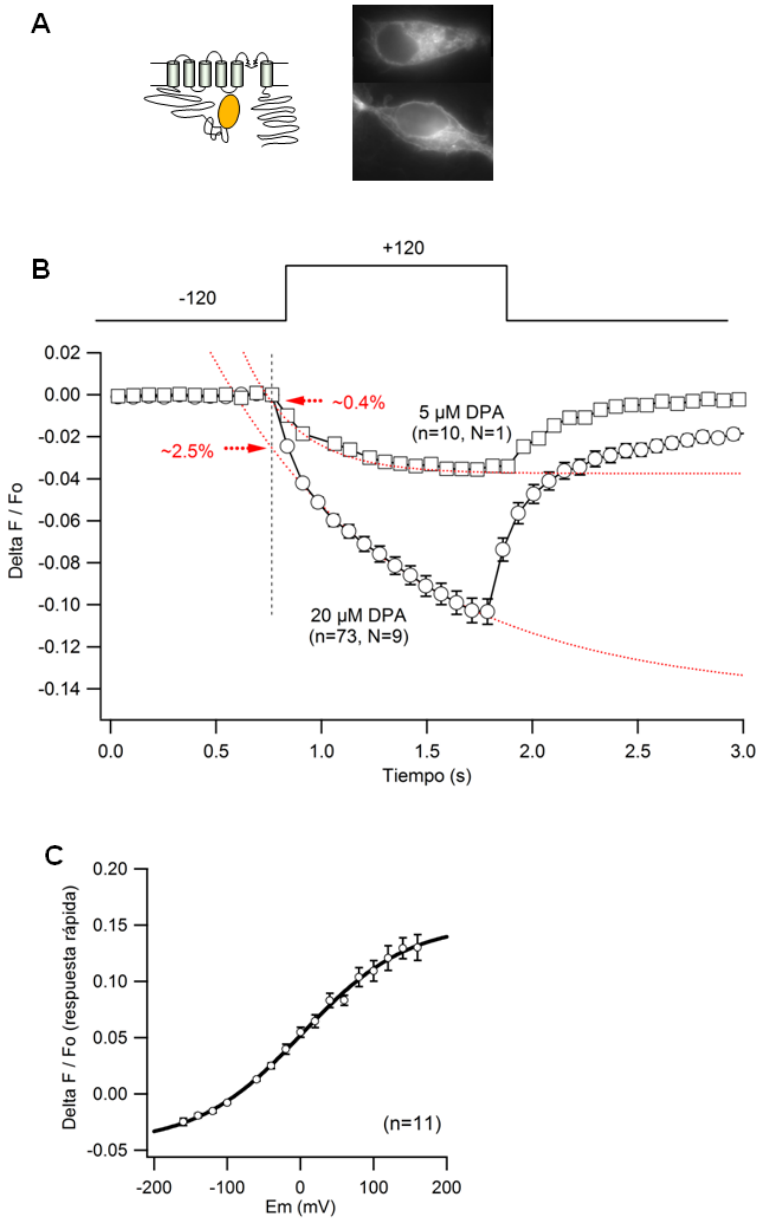


Figura 25. *Atenuación de la fluorescencia de la YFP unida al extremo amino del canal hERG por DPA en respuesta a pulsos de voltaje de 240 mV desde el potencial basal de -120 mV. A) Representación esquemática del canal hERG -Y1 e imágenes correspondientes a la fluorescencia del mismo demostrando su distribución por todo el entorno celular. B)Variación de la fluorescencia de la YFP durante los pulsos de voltaje de 1s a 120 mV. La gráfica representa el promedio de múltiples trazos obtenidos a partir de 9 células de la forma detallada en la Figura 24. La línea punteada roja corresponde a un ajuste exponencial a los datos correspondientes al movimiento lento de la DPA hacia el citoplasma. El punto de corte de dicha línea con la que marca el comienzo del pulso de despolarización indica la atenuación de la fluorescencia debida al movimiento rápido del colorante entre las dos hemicapas de la membrana plasmática (flecha roja). n indica el número de pulsos de voltaje promediados, N el número total de células usadas. C) Dependencia de voltaje de la atenuación "instantánea" de la fluorescencia inducido por la DPA para cada voltaje. La variación de fluorescencia "instantánea" se obtuvo realizando un ajuste a los datos obtenidos ante pulsos repetidos hasta distintos voltajes y extrapolando dicho ajuste al momento del inicio de los citados pulsos como se describe en el panel B. n indica el número de pulsos promediados para cada voltaje.*

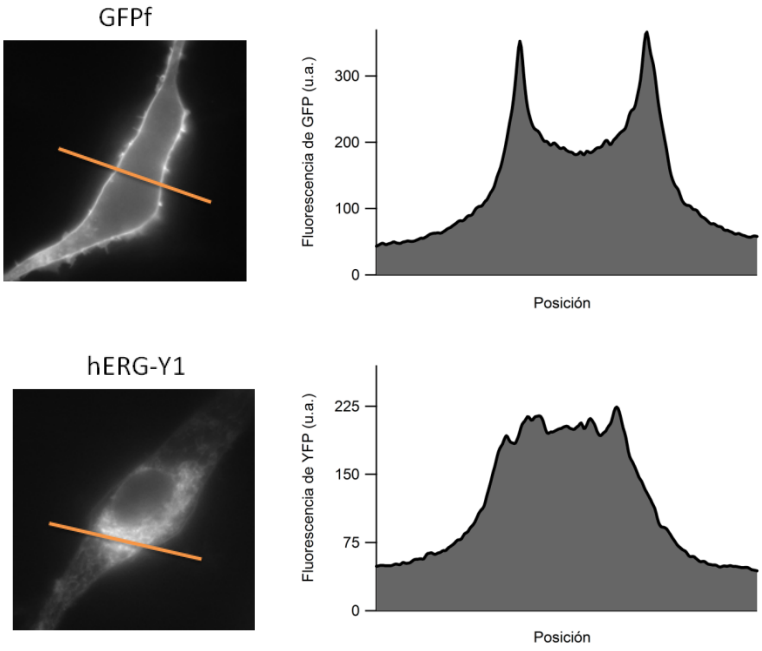


Figura 26. *Diferencias en la localización celular de la GFP farnesilada (GFPf) y del canal hERG con YFP en su extremo amino. Las imágenes corresponden a células HEK293 transfectadas con GFPf o hERG-Y1. Los perfiles de fluorescencia de la derecha corresponden a la fluorescencia cuantificada siguiendo la línea naranja en cada una de las dos fotografías de la izquierda. En el caso de la GFPf los dos picos del histograma corresponden a la fluorescencia localizada en la membrana plasmática.*

Finalmente, mediante el empleo de pulsos a distintos voltajes, también comprobamos que en el caso de los fluoróforos unidos al canal hERG la variación de la fluorescencia inducida por el movimiento rápido de la DPA se comporta de un modo dependiente de voltaje similar al observado para la GFP farnesilada (Figura 25C, ver también Figura 21D).

En la Figura 27 se muestran los resultados de un experimento en el que estudiamos el efecto del voltaje sobre el nivel de FRET entre la DPA y el canal hERG etiquetado con VFP en la posición 345 (hERG-V345). Se puede apreciar que con VFP, mucho más sensible al fotoblanqueo que la YFP, la excitación continuada del fluoróforo produce un blanqueo mayor y más rápido (Figura 27B), por lo que las consideraciones expuestas respecto a este fenómeno y a los tiempos del experimento son aquí de especial relevancia. No obstante, al igual que en el caso del canal hERG-Y1, la utilización de pulsos de voltaje de 240 mV y de los procedimientos de extrapolación a t=0 ya descritos, permiten estimar un nivel de atenuación inicial de la fluorescencia de la VFP de 2.6 ± 0.5%. Este valor, análogo al observado con la variante hERG-Y1, sugiere que tanto la posición 1 como la 345 de hERG se sitúan a una distancia similar de la membrana plasmática.

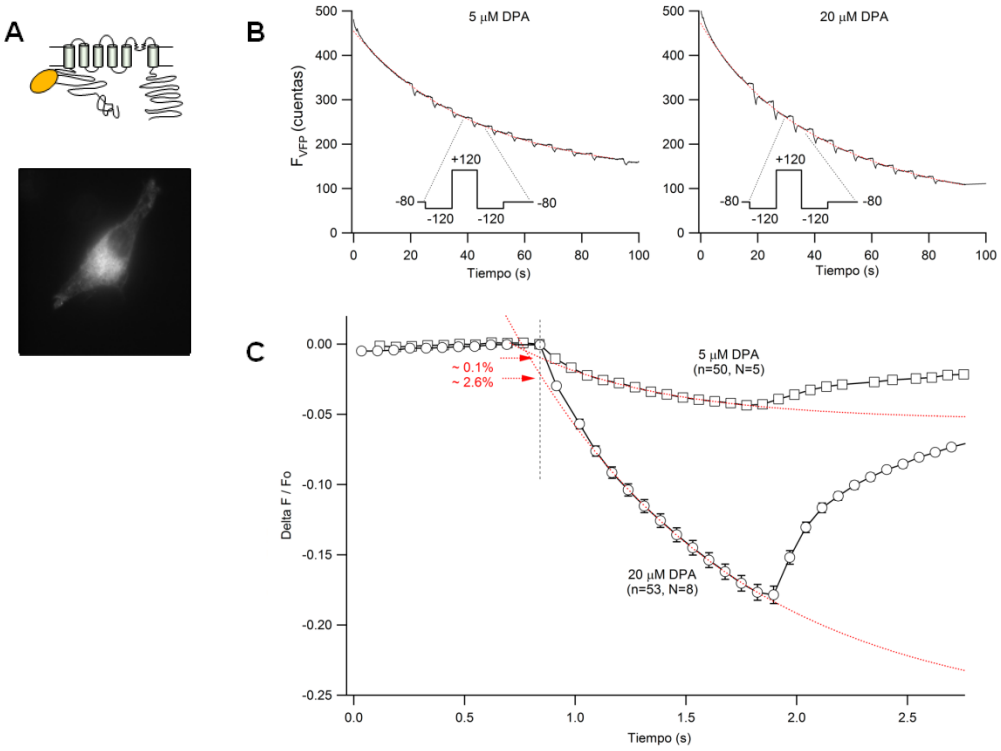


Figura 27. *Atenuación por DPA de la fluorescencia de la VFP unida al residuo 345 del canal hERG en respuesta a pulsos de voltaje de 240 mV. A) Representación esquemática de la construcción hERG-V345, así como una imagen indicativa de su distribución subcelular. B) Variación de la fluorescencia de la VFP de células HEK293 transfectadas con hERG -V345 en presencia de 5 ó 20 µM DPA. C) Promedio de las señales de fluorescencia de la VFP en respuesta a los pulsos de voltaje indicados en B. El procedimiento utilizado para la generación de los datos fue análogo al descrito en la Figura 25. n indica el número de pulsos de voltaje promediados, N el número total de células usadas.*

De modo análogo al que acabamos de detallar para el caso de hERG-Y1 y hERG-V345, determinamos el nivel de atenuación "instantánea" de la fluorescencia inducida por el movimiento rápido de la DPA en una colección de construcciones de hERG portando al fluoróforo donador (VFP) en distintos residuos: V144 (1.3±0.2%), V213 (1.1±0.3%), V219 (0.6±0.1%),V905 (1.2±0.2%), V1040 (1.8±0.5%) y V1158 (0.39±0.15%). En la Figura 28 se muestran los promedios del cambio en la fluorescencia en respuesta al voltaje de cada una de estas construcciones, y se señala el nivel de atenuación instantánea a partir de la extrapolación a tiempo cero del componente lento de la señal. Los resultados muestran la existencia de claras diferencias de la atenuación por FRET entre las distintas construcciones, lo que sugiere que las distancias entre el punto de inserción de las proteínas fluorescentes y la membrana plasmática son distintas en los distintos canales estudiados.

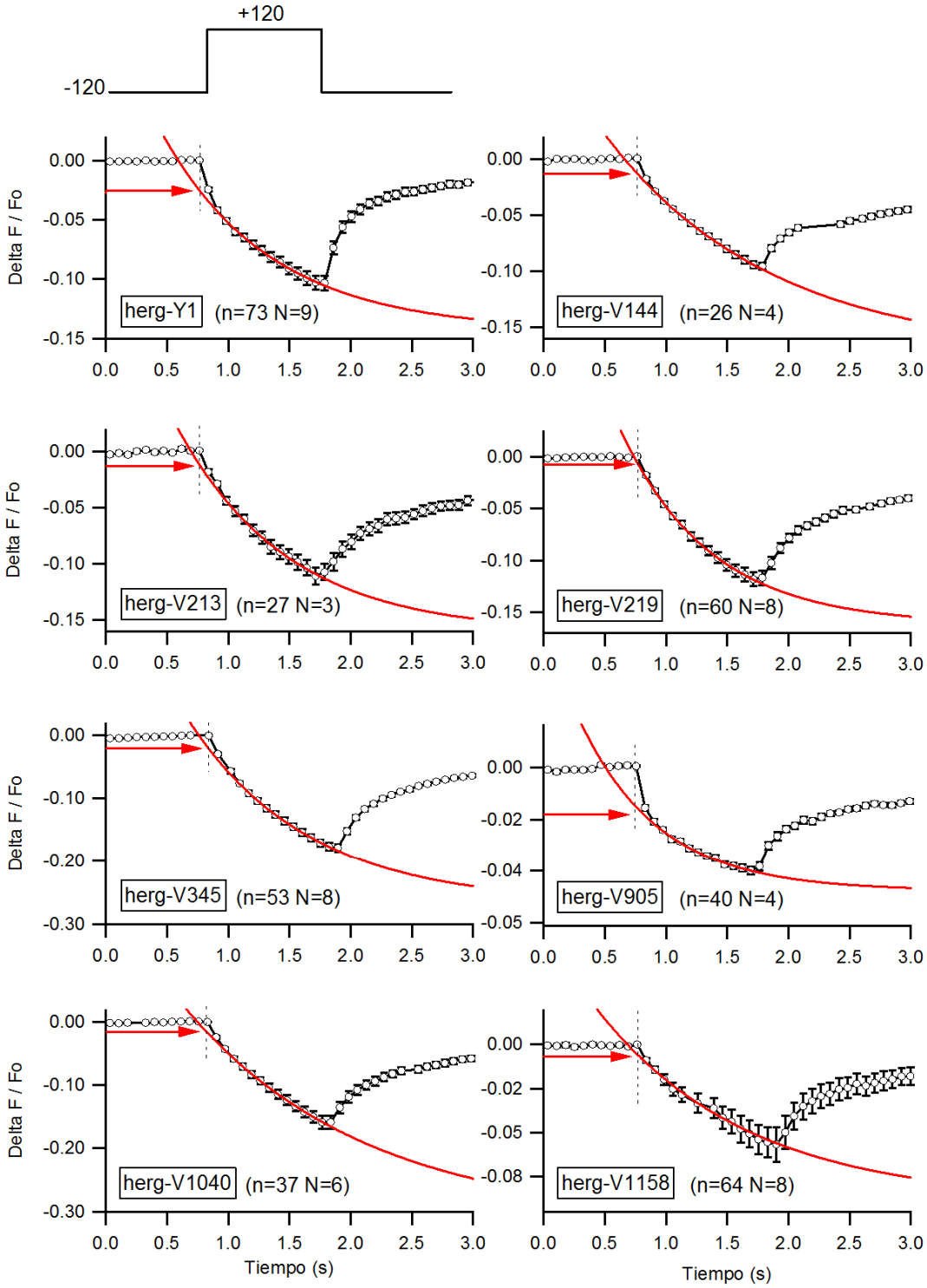


Figura 28. *Atenuación por DPA de la fluorescencia de la V/YFP insertada en distintos residuos de hERG en respuesta a pulsos de voltaje de 240 mV. Las células HEK293 fueron transfectadas con las construcciones correspondientes a los canales hERG etiquetados con YFP en el extremo amino (Y1) o con VFP en los residuos 144, 213, 219, 345, 905, 1040 y 1158. El esquema superior representa el protocolo de voltaje aplicado. En cada gráfica la línea vertical punteada señala el momento en que se despolariza la membrana y la línea roja corresponde al ajuste exponencial realizado sobre el componente lento del efecto de la DPA. La flecha roja señala la extrapolación de dicho ajuste al comienzo de la despolarización indicando el valor de la atenuación de la fluorescencia correspondiente al movimiento rápido de la DPA. n indica el número de pulsos de voltaje promediados, N el número total de células usadas.*

La cuantificación de los resultados que se acaban de describir se resume en forma de histograma en la Figura 29. Aunque es difícil traducir estos datos a valores de distancias, parece claro que los mayores niveles de atenuación de la fluorescencia corresponderían a una mayor proximidad entre la proteína fluorescente y la DPA y, por tanto a la membrana. Por ello y al menos a un nivel semicuantitativo, una interpretación directa de estos datos sería que las posiciones 1 y 345 se encuentran más cercanas a la membrana, mientras que las posiciones 905 y 1158 se muestran más alejadas. Esta interpretación resulta totalmente coherente con el modelo propuesto anteriormente para explicar los datos obtenidos durante experimentos de FRET y TIRF/FRET intrasubunitario (Miranda *et al*. 2008), confirmando la sugerencia de que el extremo amino del canal se sitúa más cercano a la membrana y el carboxilo más a alejado de ésta. Además, estos resultados también confirman las distancias relativas entre subunidades estimadas por los métodos anteriores, lo que supondría una validación adicional del propio modelo. Por último, los nuevos resultados con las construcciones etiquetadas en las posiciones 144, 213, 219 y 1040 sugieren que estos residuos se localizan en posiciones intermedias a las ocupadas por los extremos amino y carboxilo respecto a la membrana celular.

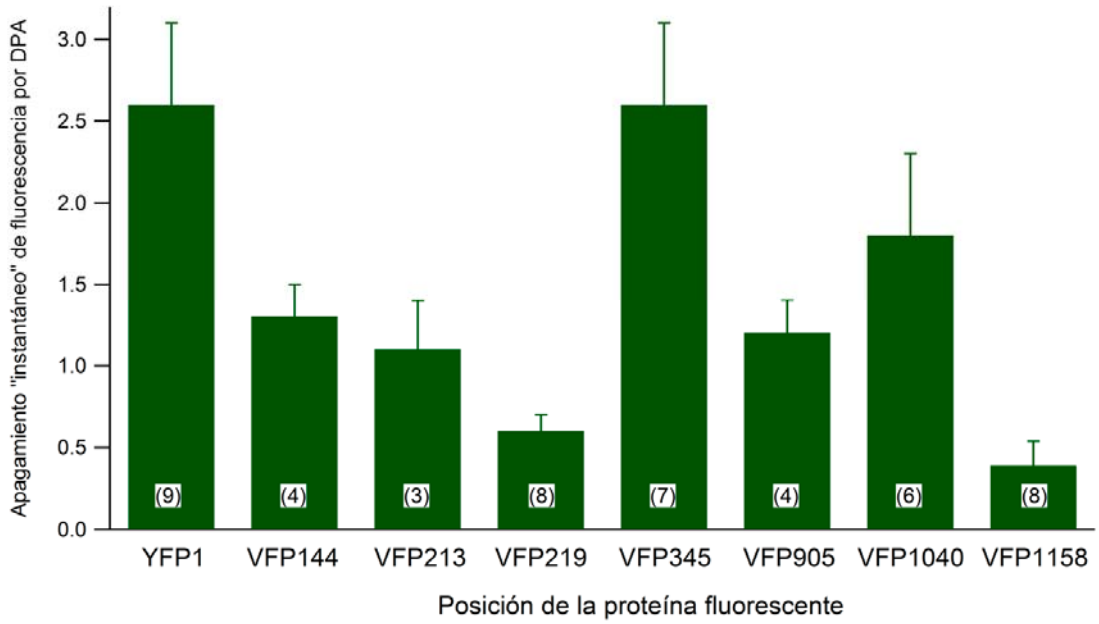


Figura 29. *Cuantificación de los efectos inducidos por el movimiento rápido del DPA en células HEK293 transfectadas con las diferentes construcciones fluorescentes del canal hERG. Los datos corresponden a los experimentos ilustrados en la Figura 28. Los números entre paréntesis en cada barra corresponden al número de células utilizadas.*

Finalmente y con el fin de conseguir una validación adicional, realizamos experimentos análogos utilizando células HEK293 transfectadas con RhopYC y canales hERG etiquetados en el amino con CFP. En el caso del Rho-pYC, su distribución en la membrana plasmática y la proximidad del fluoróforo a la misma asegurará el máximo nivel de atenuación de la fluorescencia que se puede lograr en estas condiciones. De hecho, como se muestra en la Figura 30, la atenuación de la señal de la YFP en esta construcción fue de 9 ± 0.16%, un nivel mucho mayor que el obtenido con cualquiera de las construcciones estudiadas con el canal hERG. Debido al mayor solapamiento espectral de la CFP con la DPA este valor es aún mayor en el caso de la CFP (16.8 ± 0.38%). Consecuentemente en el caso de un canal hERG portando CFP en posición 1, la atenuación de la fluorescencia también es mayor (3.9 ± 0.15%) que cuando la etiqueta utilizada es la YFP (2.6 ± 0.5%).

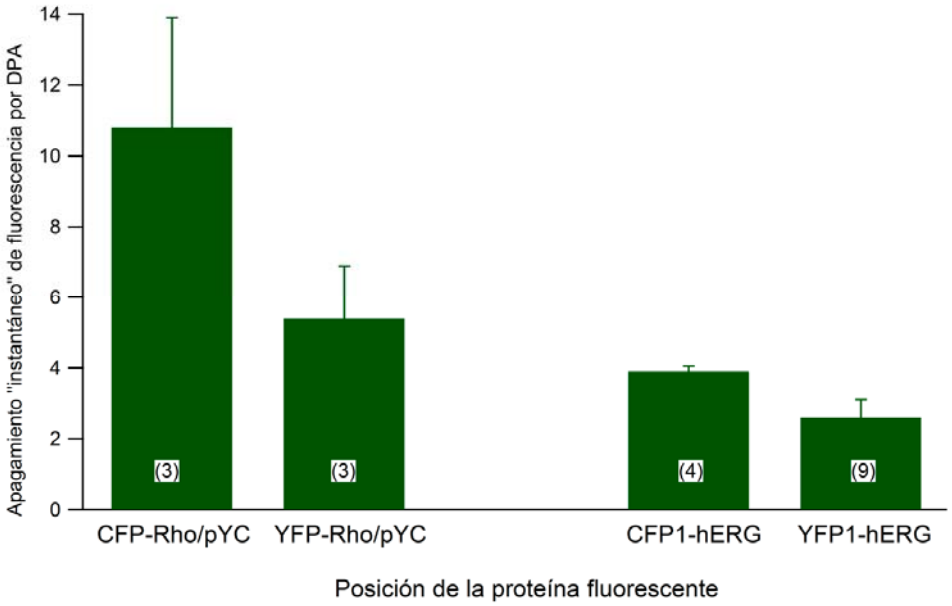


Figura 30. *Comparación de los niveles de atenuación por la DPA de la fluorescencia de la CFP y la YFP en células transfectadas con Rho-pYC y con los canales hERG etiquetados en el extremo amino. Los números entre paréntesis en cada barra corresponden al número de células utilizadas.*

3. DETERMINANTES MOLECULARES DE LA INTERACCIÓN ENTRE EL DOMINIO AMINO-TERMINAL Y EL CUERPO CENTRAL DEL CANAL hERG.

Como ya hemos indicado, un objetivo importante de nuestro trabajo consistió en profundizar en los mecanismos moleculares implicados en el control de la apertura y el cierre de hERG, en particular en la interacción entre la región amino terminal y el cuerpo central del canal a nivel del lazo intracelular S4-S5, lo cual, como ha sido descrito previamente entre otros por nuestro laboratorio, tiene una relación directa con las características de apertura y cierre

que muestra el canal hERG. En la región aminoterminal de hERG se han identificado dos dominios estructural y funcionalmente diferentes, un dominio inicial eag/PAS altamente estructurado hasta el residuo 135, y un dominio exclusivo denominado proximal (hasta el residuo 373). Mientras que este dominio proximal determina la lenta cinética de activación del canal (Viloria *et al*. 2000), el dominio eag juega un papel crucial en la lenta cinética de cierre característica del canal hERG. Para analizar la interacción funcional entre el extremo amino y el cuerpo central del canal, hemos estudiado en células de mamífero la recuperación funcional de la lenta cinética de cierre en canales que presentan alteraciones estructurales en el extremo amino (y que muestran por tanto un cierre acelerado), mediante la coexpresión de un fragmento recombinante que contiene el dominio eag de la región aminoterminal. Debido a que la ausencia del extremo amino completo puede afectar tanto al cierre como a la apertura del canal (Viloria *et al*. 2000; Alonso-Ron *et al*. 2008), estudiamos también el efecto de la adición del dominio eag recombinante no solo a canales que carecen de todo el extremo amino terminal como había sido descrito previamente (Gustina y Trudeau 2009), sino también sobre canales que presentan alteraciones estructurales menos drásticas que la ausencia del extremo amino completo. Así, los posibles efectos de la presencia del fragmento recombinante N1-135/YFP se compararon no sólo frente a canales portando una deleción casi total del amino (Δ2-370), sino también con canales en los que sólo la región correspondiente al dominio eag había sido delecionada (Δ2-135), así como con canales con mutaciones puntuales en los posibles puntos de interacción, como son la cola aminoterminal y el lazo intracelular S4-S5.

3.1 El fragmento recombinante N1-135/YFP recupera el cierre lento de canales hERG con alteraciones estructurales en el extremo amino.

Una primera aproximación para estudiar los mecanismos implicados en la recuperación del lento cierre de hERG inducida por el dominio recombinante eag en canales con alteraciones estructurales que aceleran dicho cierre, consistió en coexpresar en células HEK293 o CHO el fragmento recombiante correspondiente a dicho domino eag fusionado a la proteína fluorescente YFP (N1-135/YFP) junto con canales hERG con la totalidad del extremo amino truncado (Δ2-370), así como con canales a los que solo se les eliminó la región correspondiente al propio dominio eag (Δ2-135). En ambos casos los canales portaban la CFP en su extremo carboxilo, ya que, además de que se ha demostrado que las proteínas fluorescentes fusionadas al extremo carboxilo de hERG no alteran sus propiedades de apertura y cierre (Gustina *et al*. 2009; Miranda *et al*. 2008), la presencia de la proteína fluorescente permitirá llevar a cabo el análisis por FRET de las posibles interacciones entre el fragmento recombinante y canal.

Cuando hERG con todo el extremo amino truncado (Δ2-370) es coexpresado junto con el fragmento recombinante N1-135YFP en células HEK293, al igual que lo observado previamente en *Xenopus* (Gustina et *al.* 2009, 2011), constatamos que las corrientes hERG presentan una cinética de cierre mucho más lenta que cuando el canal truncado se expresa en ausencia del fragmento recombinante ($p<0.02$ a todos los voltajes). De hecho, dicha cinética de cierre es análoga a la exhibida por el canal hERG nativo (Figura 31A,B). En el caso del canal truncado únicamente en la región del dominio eag y que mantiene el dominio proximal intacto, la presencia del fragmento N1-135YFP también origina una cinética de cierre mucho más lenta que cuando el canal delecionado es expresado solo ($p <0.01$), lo cual demuestra que para que el fragmento recombinante conteniendo el dominio eag recupere la cinética de cierre normal del canal no es necesario eliminar todo el extremo amino, sino que es suficiente que el canal carezca de los aminoácidos correspondientes al fragmento añadido exógenamente.

Es importante indicar que en los resultados anteriores se utilizó una proporción de DNA cotransfectado de 1:3 (fragmento recombinante *vs* canal). Cuando el contenido relativo de ambas proteínas en la célula es modificado a favor de una mayor expresión del canal usando una proporción 1:10, el efecto ralentizador del fragmento recombinante es mucho menor (Figura 31C), lo que indica que dicho efecto es dependiente de la dosis del fragmento recombinante. Por otro lado, el aumento de la expresión relativa del fragmento respecto al canal usando una proporción de DNA 1:1 no incrementó la ralentización. Todo ello en conjunto indica que el efecto regulador de la cinética de cierre no se debe a la formación de uniones inespecíficas y/o irreversibles del fragmento recombinante a la molécula del canal.

Tanto en el caso de la variante hERG Δ2-370 como de la Δ2-135, la dependencia de voltaje de la activación del canal no fue diferente en ausencia o presencia del fragmento recombinante, siendo las $V_{0.5}$ (en mV) de 18.9 ± 5.1 sin fragmento y 16.8 ± 1.8 con fragmento en el caso de Δ2-370 y de 29.9 ± 2.1 sin fragmento y 28.9 ± 1.5 con fragmento en el caso de Δ2-135 (ver Figura 32). Estos resultados demuestran que el efecto sobre la velocidad del cierre producido por el fragmento recombinante no se debe a la variación de la fuerza de empuje a un determinado voltaje. Además el desplazamiento a la derecha en la dependencia de voltaje de activación en estado estacionario que es causado por las alteraciones del extremo amino no se corrige por la adición del fragmento recombinante N1-135/YFP, lo cual sugiere que este último afectaría selectivamente al cierre del canal y no al equilibrio a favor del estado cerrado que causan dichas alteraciones estructurales.

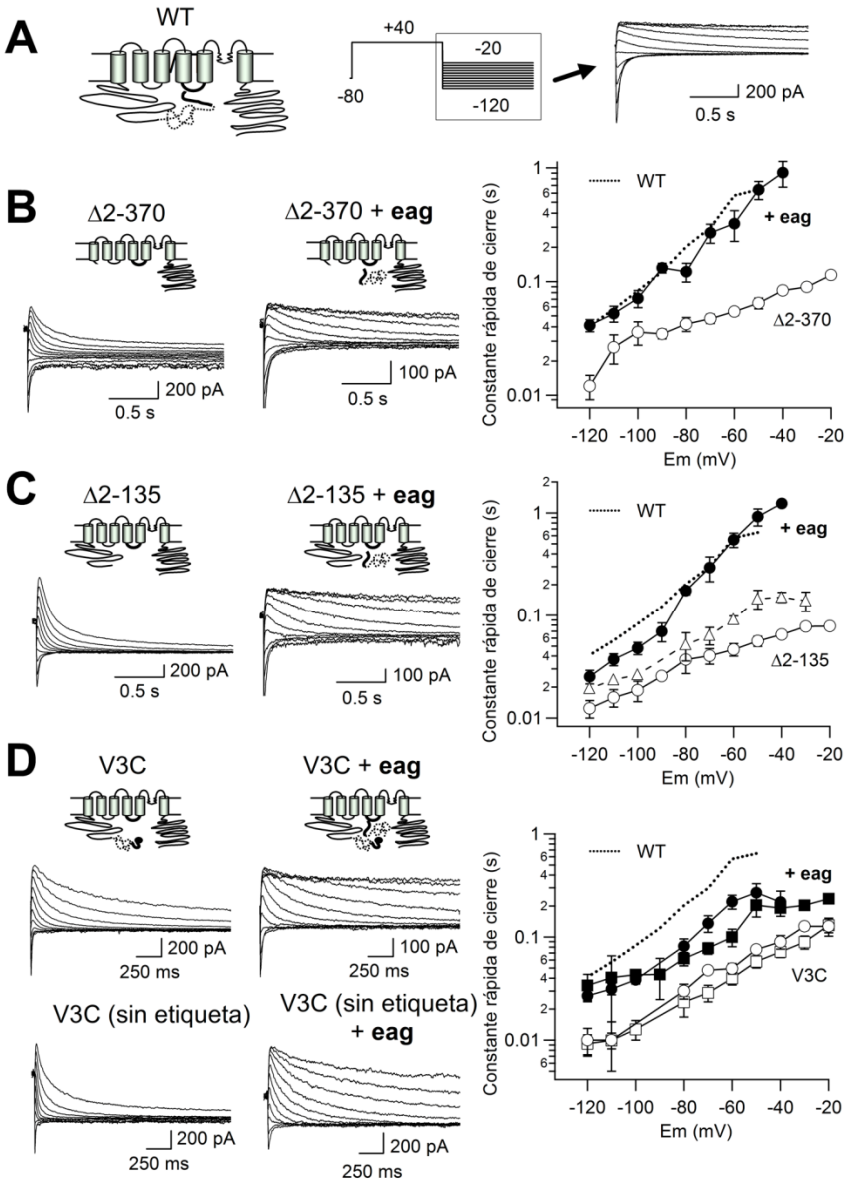


Figura 31. *Recuperación de la ralentización del cierre inducida por el dominio eag recombinante en canales h-ERG portando diferentes alteraciones estructurales del extremo amino terminal. A) Representación esquemática del canal hERG. La región PAS del domnio eag se representa como una línea discontinua. El lazo S4-S5 y el segmento inicial del extremo amino terminal (residuos 1-26) se ilustran con trazos gruesos. A la derecha se muestra el protocolo de pulsos empleado para el estudio de las cinéticas de cierre y una familia de corrientes de cola obtenidas de canales hERG nativos durante los tiempos enmarcados por el recuadro. Nótese el incremento inicial en la corriente debido a la recuperación de la inactivación y la subsiguiente caída donde se miden las tasas de cierre a cada voltaje de repolarización. B-D) Efecto del fragmento recombinante N1-135/YFP en la cinética de cierre de canales hERG carentes de la práctica totalidad del amino terminal (Δ2-370; panel B), que solo carecen del dominio eag (Δ2-135; panel C) o que portan la mutación puntual V3C (esfera negra en el esquema) al inicio del extremo amino (V3C; panel D). Los esquemas de los canales y las corrientes de cola obtenidas mediante los protocolos ilustrados en A se muestran a la izquierda. Para simplificar los esquemas, se han omitido las proteínas fluorescentes presentes en el extremo C terminal de los canales y de los fragmentos recombinantes. A la derecha se muestran gráficos de las constantes de cierre rápidas a diferentes voltajes de repolarización derivadas de ajustes biexponenciales a la fase de decaimiento de las corrientes de cola (ver métodos). Como comparación se muestran como líneas discontínuas datos del canal nativo (WT). Los símbolos blancos y negros corresponden a datos obtenidos en ausencia y presencia del fragmento recombinante, respectivamente. Las células fueron transfectadas con una proporción de DNA 3:1 (canal y fragmento recombinante). Los triángulos en C corresponden a una proporción 10:1. Los cuadrados en D corresponden a células en las que el canal V3C no lleva etiqueta fluorescente. En todos los casos n≥6.*

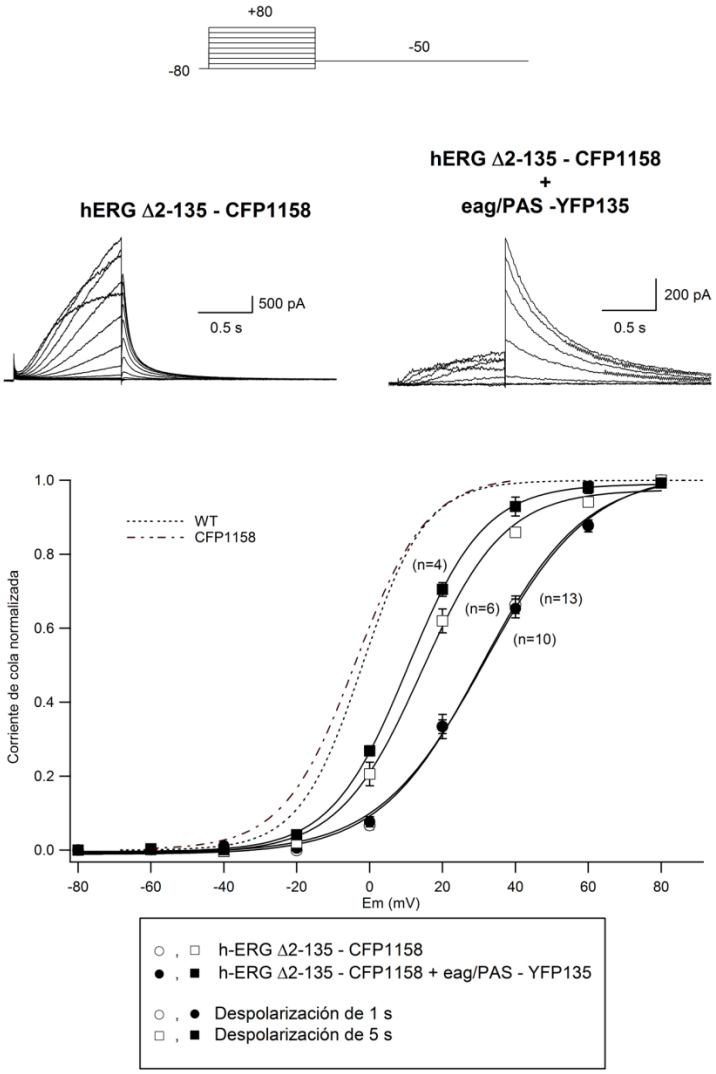


Figura 32. *El fragmento recombinante N1-135/YFP no afecta al desplazamiento a la derecha de la dependencia de voltaje del canal Δ2-135 hERG. En la parte superior se muestran los protocolos de pulsos y familias de corrientes representativas obtenidas en presencia o ausencia del fragmento recombinante. En la parte inferior se muestran las curvas de dependencia de voltaje normalizadas. Los datos fueron obtenidos a partir de las corrientes de cola a -50 mV después de pulsos de 1 o 5 s entre -80 y +80 mV a intervalos de 20 mV a partir de un potencial basal de -80 mV. Las líneas contínuas corresponden a curvas de Boltzman a las que mejor se ajustan los datos. Como comparación se muestran las curvas de un canal nativo (WT) con y sin proteína fluorescente en su extremo carboxilo.*

Debido a que también se ha propuesto que al segmento inicial del dominio eag juega un papel fundamental en el cierre del canal (Ng *et al*. 2011; Muskett *et al*. 2011; Li *et al*. 2010), estudiamos el comportamiento de un canal con una mutación puntual en el residuo 3 en presencia o ausencia del fragmento N1-135/YFP. Como se ve en la Figura 31D el canal hERG portando la mutación V3C, presenta una rápida cinética de cierre. Ese cierre rápido es eficazmente ralentizado cuando el canal se coexpresa con el fragmento recombinante, lo que indica que la mutación de la Val 3 induce una separación suficiente del dominio eag respecto a

la maquinaria de cierre que permite la unión del fragmento recombinante y por tanto la recuperación del cierre lento. Por otra parte, en la Figura 31D también se muestran los resultados obtenidos con el canal hERG-V3C que no porta una proteína fluorescente en el extremo carboxilo. La similitud de los resultados con y sin fluoróforo son un indicador adicional de que el efecto observado no responde a efectos inespecíficos tales como la oligomerización de la proteína fluorescente del canal con la de los fragmentos N1-135-YFP.

3.2 La recuperación de la lenta cinética de cierre mediada por el dominio recombinante eag depende del lazo S4-S5.

Aunque se ha propuesto que el lazo S4-S5 es importante en la influencia que ejerce el extremo amino de hERG sobre las propiedades de apertura y cierre, y que se ha demostrado que mutaciones puntuales en dicho lazo producen una aceleración del cierre similar al ocasionado por truncaciones del amino terminal (Figura 33B), no existía una evidencia directa del contacto físico entre ambos dominios. Si existen estas interacciones, se esperaría que alteraciones en la estructura del lazo S4-S5 impidan o dificulten la acción del fragmento eag recombinante ralentizando el cierre. Como se ilustra en la Figura 33B, el fragmento eag recombinante no es capaz de recuperar el cierre lento de un canal hERG con una mutación puntual en el lazo S4-S5 (hERG Y542C). Esto no se debe a que el fragmento no pueda competir con el dominio eag endógeno ya que el fragmento N1-135/YFP tampoco puede ralentizar el cierre de canales hERG Y542C carentes del domino eag (hERG Δ2-135/Y542C, Figura 33C). La mutación de la tirosina 542 acelera por sí sola el cierre del canal. Sin embargo, esto no ocurre si la mutación a cisteína es realizada sobre el residuo de glicina 546 (Alonso-Ron *et al*., 2008; Van Slyke *et al*., 2010). Por ello y para comprobar la especificidad del efecto de la mutación Y542C, coexpresamos también el fragmento N1-135/YFP junto con un canal hERG Δ2-135/G546C. Los resultados mostraron que en este caso se produce una total recuperación del cierre lento del canal (Figura 33D). Esto indica que la modificación de la tirosina 542 impide de forma específica la unión no covalente del dominio eag recombinante con el cuerpo central del canal, anulando su capacidad para recuperar el cierre normal del canal.

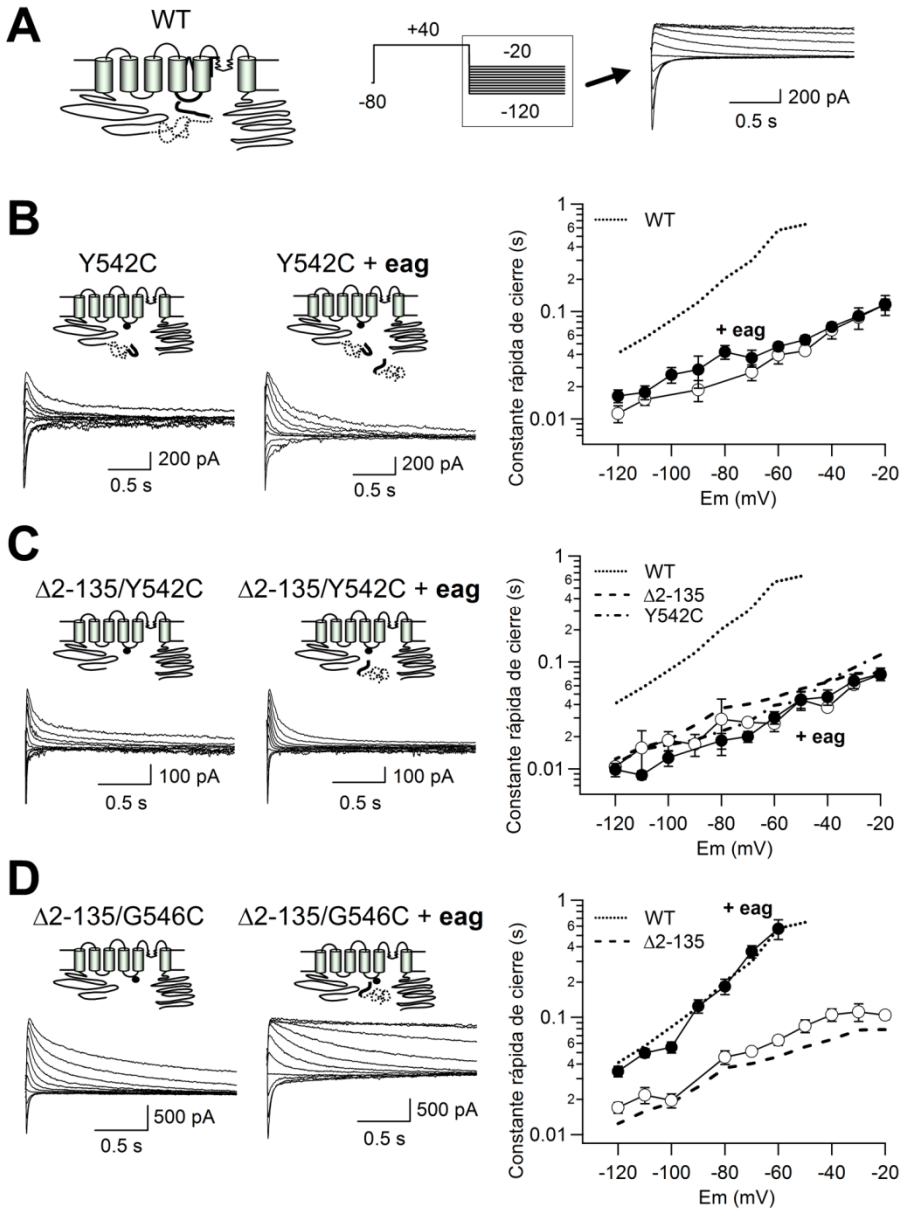


Figura 33. *El fragmento recombinante N1-135/YFP no recupera el cierre lento de los canales hERG que portan la mutación Y542C en el lazo S4-S5. A) Representación esquemática del canal hERG nativo (WT) y una familia representativa de corrientes de cola obtenidas con el protocolo indicado. B) Ausencia de efecto del fragmento recombinante N1-135/YFP sobre la cinética de cierre de canales Y542C. A la izquierda se muestran esquemas del canal y familias de corrientes de cola representativas. A la derecha se muestran gráficas con las constantes rápidas de cierre a diferentes voltajes de repolarización. Los círculos blancos y negros representan respectivamente los datos obtenidos en ausencia (n=10) o en presencia (n=6) del fragmento eag recombinante. Se muestran los datos del canal nativo (WT) a modo de comparación. C) El fragmento recombinante N1-135/YFP no ralentiza la cinética de cierre de canales Δ2-135 portando la mutación Y542C. Los círculos blancos y negros representan respectivamente los datos obtenidos en ausencia (n=6) o en presencia (n=5) del fragmento recombinante. Se muestran los datos de los canales nativo (WT), Δ2-135 y Y542C a modo de comparación. D) El fragmento recombinante N1-135/YFP recupera completamente la cinética de cierre lenta de un canal Δ2-135 portando la mutación G546C. Los círculos blancos y negros representan respectivamente los datos obtenidos en ausencia (n=6) o en presencia (n=8) del fragmento recombinante. Se muestran los datos de los canales WT y Δ2-135 a modo de comparación.*

3.3 Mutaciones en los residuos iniciales del dominio eag recombinante anulan la recuperación del cierre lento en canales hERG Δ2-135.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores y puesto que, tal como indican resultados de nuestro laboratorio, existe una proximidad física entre el extremo amino terminal y el lazo S4-S5, ya que se puede formar un puente disulfuro entre ambos si en ellos se introducen cisteínas (de la Peña *et al*. 2011), estudiamos si mutaciones en los residuos iniciales del fragmento recombinante N1-135/YFP producían un efecto análogo al de la mutación Y542C, impidiendo la ralentización del cierre. Así, tal como se puede ver en la Figura 34, la mutación V3C en el fragmento recombinante hace que la lenta cinética de cierre de un canal hERG Δ2-135, solo se recupere parcialmente. Además, si en lugar de mutar la posición 3 se introduce una cisteína en los residuos 4 o 6 (R4C y G6C), estos dominos eag recombinantes no son capaces de ralentizar en absoluto la cinética de cierre de hERG Δ2-135, siendo ésta igual a la que presenta el canal truncado. Por último, si el fragmento N1-135/YFP porta la mutación V8C, se observa que su capacidad de ralentizar el cierre de un canal Δ2-135 es notable aunque algo menor que el exhibido por el fragmento recombinante intacto sin ninguna mutación. Estos resultados demuestran la importancia de mantener una estructura inalterada en el comienzo del dominio eag para mantener su funcionalidad. Además, dado que en todos estos casos tanto el canal truncado como el fragmento recombinante se encuentran fusionados a proteínas fluorescentes pero que no todos los fragmentos tienen la misma efectividad ralentizando el cierre, estos datos son una comprobación adicional de que la ralentización del cierre no depende de la presencia de dichas proteínas fluorescentes.

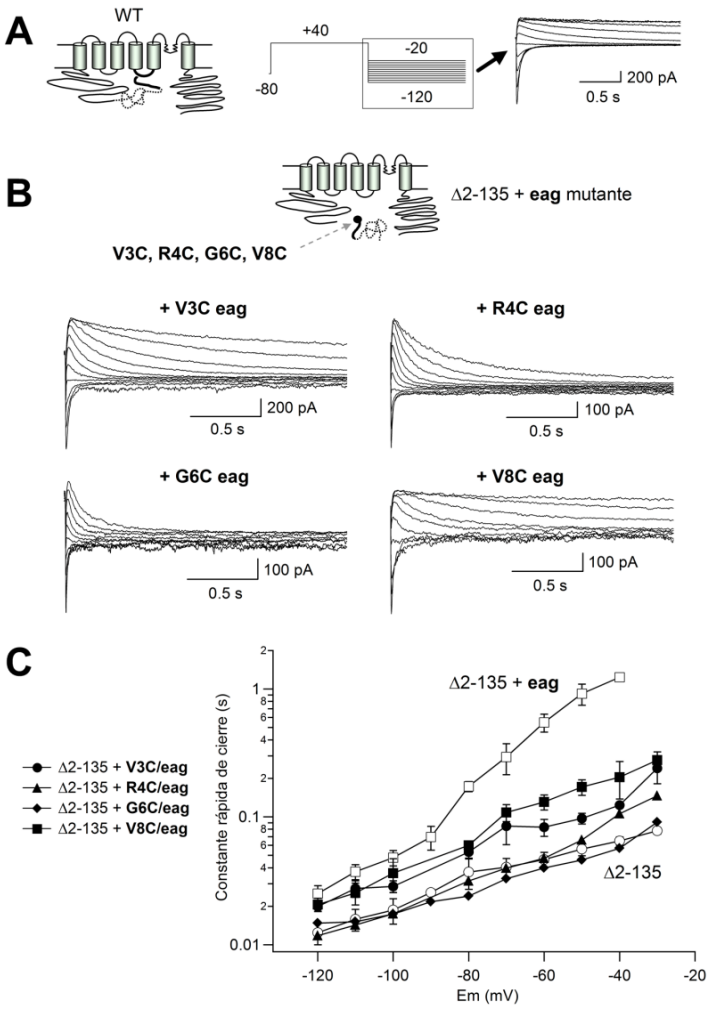


Figura 34. *Las mutaciones en el inicio del fragmento recombinante N1-135/YFP afectan a su capacidad para recuperar el cierre lento de canales hERG Δ2-135. A) Representación esquemática del canal nativo (WT) y una familia representativa de corrientes de cola obtenidas con el protocolo indicado. B) En la parte superior se muestra un esquema de un canal hERG Δ2-135 y el fragmento recombinante con las mutaciones marcado como un punto negro. Las proteínas fluorescentes se han omitido en los esquemas para mayor claridad. En la parte inferior se muestran familias de corrientes de cola representativas de canales hERG Δ2-135 coexpresados con el fragmento recombinante N1-135/YFP portando las mutaciones indicadas. C) Gráfica que muestra las constantes rápidas de cierre a diferentes voltajes del canal hERG Δ2-135 coexpresado con el fragmento recombinante mutado. Como comparación se muestra la cinética exhibida por el canal Δ2-135 en ausencia (círculos blancos) y en presencia (cuadrados blancos) del fragmento recombinante no mutado. n = 4, 5, 10 y 3 para Δ2-135 + V3C/eag, Δ2-135 + R4C/eag, Δ2-135 + G6C/eag y Δ2-135 + V8C/eag, respectivamente.*

3.4 Mutaciones LQT2 en el dominio eag recombinante también impiden la recuperación del cierre lento en canales hERG Δ2-135.

También hemos introducido en el fragmento recombinante mutaciones en el dominio PAS que se han descrito como causantes de síndrome QT largo de tipo II y que, entre otros defectos, se caracterizan por exhibir una cinética de cierre rápida. En concreto hemos introducido las mutaciones K28E y R56Q. En ambos casos, estas mutaciones anulan la recuperación del cierre por parte del fragmento recombinante, obteniéndose unas

constantantes rápidas de cierre equivalentes a las que se obtienen si se transfecta el canal Δ2-135-hERG sólo (Figura 35). Estos resultados indican que la alteración de la estructura altamente ordenada del dominio PAS por efecto de estas mutaciones afecta a la capacidad del dominio eag/PAS recombinante completo para interaccionar con el cuerpo central del canal y recuperar la lenta cinética de cierre. De hecho, resultados recientes del laboratorio indican que se requiere la presencia del dominio PAS altamente estructurado para que se produzca la interacción física entre el segmento inicial del extremo amino y el lazo S4-S5 (de la Peña *et al*. 2013).

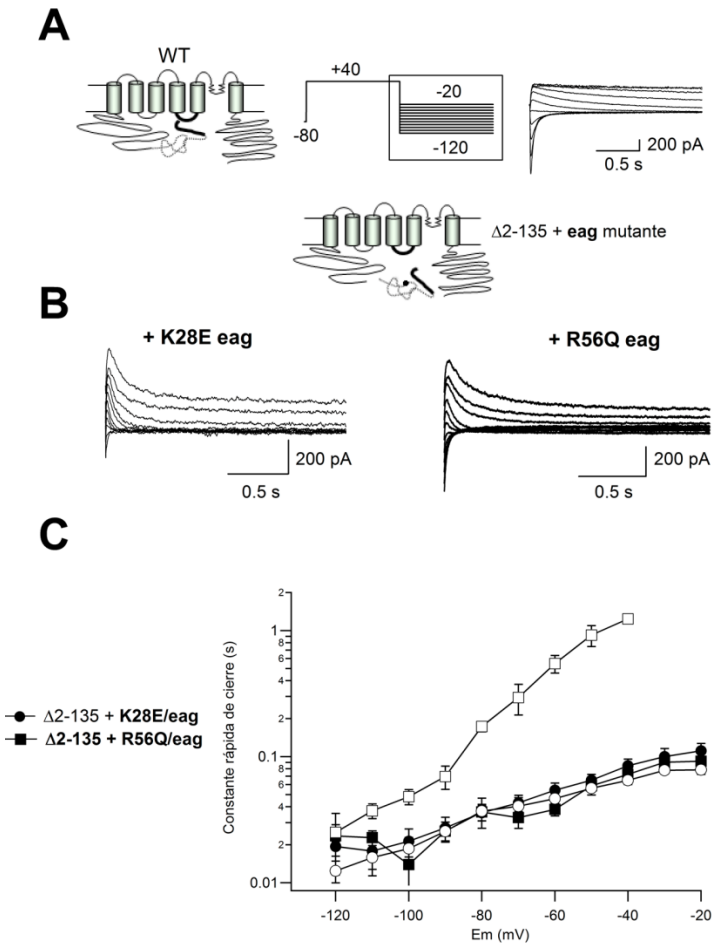


Figura 35. *Las mutaciones causantes de LQT2 en el dominio PAS del fragmento recombinante N1-135/YFP bloquean a la capacidad de éste para recuperar el cierre lento de canales hERG Δ2-135. A) Representación esquemática del canal nativo (WT) y una familia representativa de corrientes de cola de éste obtenidas con el protocolo indicado. B) En la parte superior se muestra un esquema que ilustra un canal hERG Δ2-135 y el fragmento recombinante con la posición arbitraria de las mutaciones marcada como un punto negro. Las proteínas fluorescentes se han omitido en los esquemas para mayor claridad. En la parte inferior se muestran familias de corrientes de cola representativas de canales hERG Δ2-135 coexpresados con el fragmento recombinante N1-135/YFP portando las mutaciones indicadas. C) Gráfica en que se muestran las constantes rápidas de cierre a diferentes voltajes del canal hERG Δ2-135 coexpresado con el fragmento recombinante mutado en cada una de las dos posiciones tal como se indica a la izquierda. A modo de comparación también se muestra la cinética exhibida por el canal carente del dominio eag en ausencia (círculos blancos) y en presencia (cuadrados blancos) del fragmento recombinante no mutado. n = 7 y 5 para Δ2-135 + K28E/eag y Δ2-135 + R56Q/eag respectivamente.*

3.5 Detección mediante FRET de interacciones entre el canal y el dominio recombinante eag.

Para comprobar de un modo directo si existe una proximidad física entre el canal y el fragmento eag recombinante en aquellos casos en los que se recupera la cinética de cierre normal de hERG, recurrimos el empleo de TIRF/FRET. En este caso el uso de TIRF reviste especial importancia, ya que por una parte, de haber proximidad física entre dominio eag recombinante y canal, ésta solo se dará en los canales correctamente ensamblados en la membrana. Por otra parte, el citoplasma estará inundado del fragmento eag-YFP soluble, lo que generaría mucha señal inespecífica en condiciones de epifluorescencia.

Como se muestra en la Figura 36A, las células HEK293 cotransfectadas con el fragmento recombinante N1-135/YFP y el canal hERG Δ2-135 etiquetado con CFP en su extremo carboxilo muestran un considerable nivel de FRET (13.25 ± 1.05%, n=12). Este valor es análogo al obtenido con un canal completo doblemente etiquetado en sus extremos amino y carboxilo (hERGY1-C1158; valor de FRET: 13.47 ± 1.04%, n=35, ver Figura 13). Esto demuestra que el fragmento recombinante se encuentra muy cerca de hERG Δ2-135 en la membrana, una proximidad compatible con la existencia de una interacción física entre ambos que fuese la base de la recuperación funcional de la lenta cinética de cierre del canal. Por el contrario, al cotransfectar el fragmento recombinante junto con un canal nativo etiquetado con CFP en su extremo carboxilo no se obtuvo un nivel apreciable de FRET (0.49 ± 2.99%, n=12). De nuevo, estos datos serían coherentes con el hecho de que en este caso la presencia del dominio eag endógeno estaría impidiendo el acceso del fragmento recombinante a su sitio de interacción con el canal. Una prueba adicional de que estas interpretaciones son correctas es aportada por los datos obtenidos con el canal hERG con la mutación V3C. De nuevo en este caso se obtuvo un nivel considerable de FRET (9.61 ± 3.8%, n=13), que si bien fue algo más bajo que el obtenido con el canal Δ2-135, supuso una diferencia que no alcanzó significación estadística (p = 0.36 *vs* Δ2-135). De hecho, esta ligera disminución del nivel de FRET es totalmente coherente con la también ligeramente menor capacidad del fragmento recombinante para recuperar la cinética del cierre del canal V3C en comparación con la del canal Δ2-135 (ver Figura 31D).

3.6 Efecto de mutaciones en el lazo S4-S5 y en el extremo amino del fragmento eag recombinante sobre los niveles de TIRF/FRET.

Los resultados descritos en el apartado anterior indican que la ralentización del cierre ejercida por el fragmento recombinante es acompañada por un considerable nivel de FRET entre éste y el canal, fruto de una interacción física entre ambos. Por ello, nuestro siguiente

paso consistió en comprobar si las alteraciones estructurales en el fragmento recombinante y en el canal que dificultan la recuperación funcional del cierre, también impiden la interacción física entre ambos. Como se observa en la Figura 36A, la mutación Y542C en el canal Δ2-135 hace que no se detecte FRET entre dicho canal y el fragmento recombinante, lo cual es consistente con el hecho de que no se observe una recuperación funcional del cierre de dicho canal. Por el contrario, cuando la mutación presente en el lazo S4-S5 del canal Δ2-135 fué G546C, de nuevo se obtuvo un considerable valor de FRET de 12.5 ± 2.1% (n=11, *p*=0.66 *vs* Δ2-135), análogo al obtenido con el canal Δ2-135 sin mutar. Este resultado de nuevo concuerda con el hecho de que esta mutación no impide que el fragmento recombinante recupere la lenta cinética de cierre del canal.

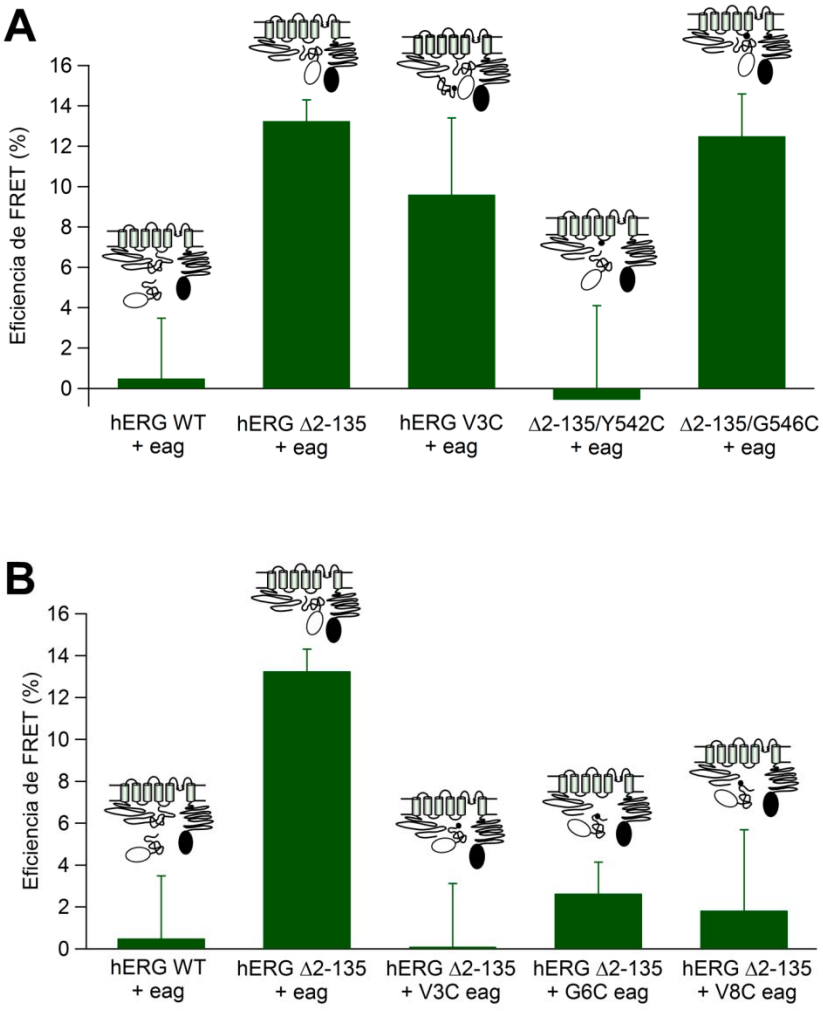


Figura 36. *Comparación de los niveles de TIRF-FRET entre fluoróforos unidos al canal hERG y distintos fragmentos recombinantes N1-135/YFP. Efecto de mutaciones puntuales en el extremo amino y en el lazo S4-S5 de hERG sobre la eficiencia de FRET entre el fragmento recombinante N1-135/YFP y canales hERG Δ2-135 marcados con CFP en su extremo carboxilo. Se muestran los promedios de 7-13 células. B) Efecto de mutaciones puntuales en los residuos iniciales del fragmento eag recombinante sobre los niveles de FRET. Se muestran los promedios de 8-13 células. Tanto en A y B se muestran como comparación los datos de la coexpresión del fragmento recombinante y el canal nativo (WT) o el canal truncado Δ2-135.*

Por último, utilizando un fragmento N1-135/YFP con las mutaciones V3C, G6C ó V8C en su parte inicial, observamos en todos los casos unos niveles muy bajos de FRET (ver Fig.36B). Estos resultados fueron más discordantes con los obtenidos de la recuperación de la cinética de cierre lenta, ya que los mutantes V3C y V8C son capaces de recuperar parcialmente la cinética normal del canal pero no rinden prácticamente ninguna señal de FRET. Dado que estas mutaciones se localizan en el segmento inicial del dominio eag que corresponde a una región estructuralmente desordenada y flexible (Ng *et al*. 2011; Muskett *et al*. 2011; Li *et al*. 2010), es posible que causen pequeñas alteraciones en la orientación relativa o la distancia entre los fluoróforos, lo que limita el nivel de FRET, aún cuando no causen más que una reducción funcional parcial en las interacciones entre el dominio eag y el canal.

3.7 El fragmento recombinante N1-135 codificado en un RNA bicistrónico recupera el cierre lento de canales hERG con alteraciones estructurales en el extremo amino.

Una de las limitaciones de la expresión de fragmentos recombinantes fusionados a proteínas fluorescentes radica en que debido al elevado tamaño de las últimas (238 aminoácidos), esta tecnología no es útil para la expresión de fragmentos de tan solo unos pocos aminoácidos. Por otra parte, es necesaria la detección o visualización de la expresión de estos fragmentos a la hora de interpretar sus posibles efectos. Los resultados descritos en los apartados anteriores indican que la presencia de las proteínas fluorescentes unidas al fragmento recombinante no son determinantes en su capacidad de recuperar funcionalmente el cierre lento de canales hERG con alteraciones en el extremo amino. Con el fin de realizar experimentos similares usando fragmentos recombinantes que no porten la etiqueta fluorescente pero asegurando su presencia en la célula utilizamos un RNA bicistrónico con el fragmento eag codificado en él, seguido de GFP que se sintetizará independientemente y nos servirá como indicador de transfección. Para la síntesis de este RNA bicistrónico se utilizó el plásmido pIRES, que contiene la secuencia del sitio de unión al ribosoma (IRES) del virus de la encefalomiocarditis flanqueado por dos sitios múltiples de clonación. Debido a que IRES está parcialmente desactivado, el gen clonado en el segundo sitio múltiple de clonación (GFP) se traducirá con menor eficiencia que el gen clonado en el primero (fragmento eag recombinante).

Como se muestra en la Figura 37, el estudio de las células cotransfectadas con el plásmido codificante del RNA bicistrónico junto con el canal hERG Δ2-135 dio lugar a un resultado similar

al conseguido con el fragmento recombinante portando la YFP (ver atrás). Este resultado aporta una prueba inequívoca de que la proteína fluorescente no está relacionada con la capacidad del fragmento recombinante para ralentizar el cierre del canal.

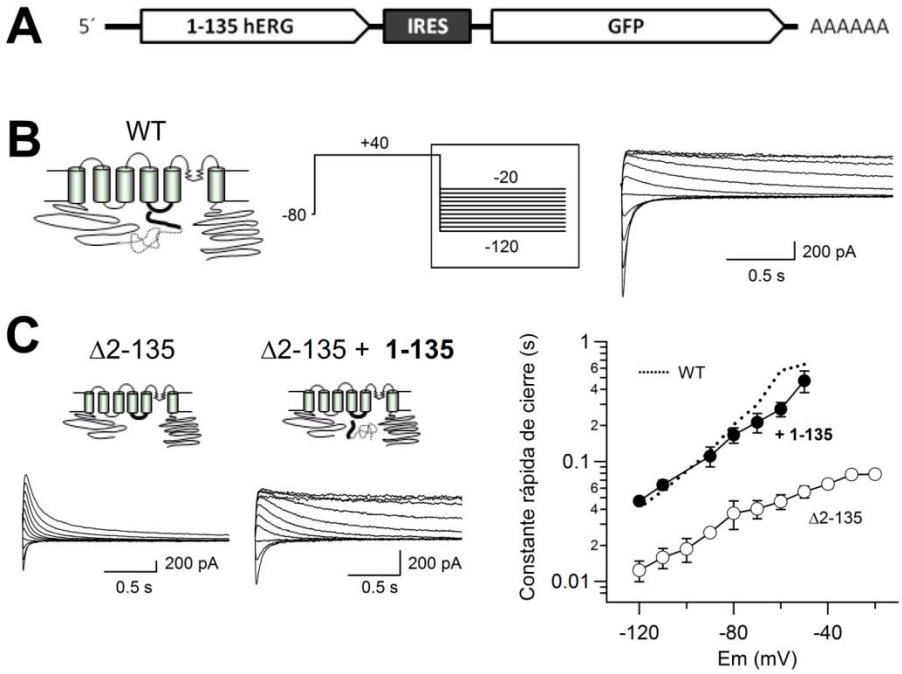


Figura 37. *El fragmento N1-135 codificado en un RNA bicistrónico recupera el cierre lento de canales hERG Δ2-135. A) Representación esquemática del RNA bicistrónico que contiene el fragmento N1-135 y la GFP. B) Representación esquemática del canal nativo (WT) y una familia representativa de corrientes de cola, obtenidas con el protocolo indicado. C) A la izquierda se muestran representaciones esquemáticas de las construcciones utilizadas y familias de corrientes de cola representativas. A la derecha se muestran las constantes rápidas de cierre del canal Δ2-135 hERG en ausencia (círculos blancos, n=11) o presencia del fragmento 1-135 recombinante (círculos negros, n=6). La línea punteada indica los valores de la constante de cierre obtenida con el canal nativo (WT).*

3.8 El fragmento recombinante N1-15 codificado en un RNA bicistrónico compite con el dominio eag endógeno en la interacción con el cuerpo central del canal.

Una vez comprobado, que el uso del RNA bicistrónico era útil para el estudio de los efectos de los fragmentos recombinantes, nos planteamos su utilización para discernir en que zonas del dominio eag reside su capacidad de interaccionar con la maquinaria de cierre del canal ya que el segmento inicial del dominio eag tiene un papel relevante en la interacción de éste con el lazo S4-S5, y es crucial para la ralentización del cierre, comenzamos coexpresando canales truncados junto con un fragmento recombinante con tan solo los primeros 15 aminoácidos de la proteína. Sorprendentemente, tanto en el caso del canal sin la práctica totalidad del extremo amino (Δ2-370), como en el caso del canal que solo carece del dominio

eag (Δ2-135), observamos que la presencia del pequeño fragmento N1-15 era insuficiente para la recuperación de la lenta cinética de cierre (Figura 38C y D). Este resultado negativo no es debido a la ausencia de expresión del fragmento en la célula ya que, los datos obtenidos cotransfrectando el plásmido pIRES que lo codifica junto con el canal hERG nativo indican que esta no es la razón. Así, como se muestra en la Figura 38E, la cinética de cierre del canal completo aparece enormemente acelerada en presencia del péptido 1-15, si bien este efecto sólo es detectable a potenciales más despolarizados a los que el cierre del canal es muy lento, minimizándose gradualmente a potenciales más negativos, hasta desaparecer por completo a voltajes cercanos a -120 mV. Estos datos demuestran que el fragmento 1-15 está realmente presente en las células transfectadas. Por otro lado, sugieren que la ausencia de efecto es debida a su incapacidad para alcanzar de forma funcionalmente efectiva su punto de interacción en ausencia del resto del dominio eag. Así pues, este dominio y especialmente su parte más estructurada (PAS) parece ser necesario para la colocación precisa del segmento inical, o bien un cofactor imprescindible en la ralentización del cierre. Además, los datos obtenidos con el canal nativo, indican que el segmento 1-15 aislado es capaz de competir de forma efectiva con su homólogo endógeno, limitando su capacidad para ralentizar el cierre, pero sólo a voltajes a los que este proceso es lento y no a aquéllos a los que dicho cierre ocurre de forma normal a mayor velocidad, una vez que el efecto ralentizador del extremo amino ha sido minimizado por la operación del resto de la maquinaria de desactivación.

En resumen nuestros resultados indican que a diferencia de lo observado con el fragmento eag completo (residuos 1-135), la presencia del pequeño péptido correspondiente a los residuos 1-15, no es suficiente para recuperar la lenta cinética de cierre de un canal carente del dominio eag. Estos datos parecen contrastar con resultados previos indicando que la adición del péptido 1-16 de hERG a macroparches de membranas de oocitos expresando canales hERG truncados en el amino, puede restaurar parcialmente el lento cierre propio del canal nativo (Wang *et al*. 2000). Esta recuperación parcial fue interpretada como una indicación de que quizás el fragmento 1-16 pudiese necesitar "una estructura más compleja" para poder llevar a cabo la restauración de la función (Wang *et al*. 2000). Nuestros datos con el fragmento 1-135 completo, sugieren que dicha estructura "adicional" podría ser el resto del dominio eag necesaria para el adecuado posicionamiento del fragmento inicial 1-15 respecto a la maquinaria de cierre.

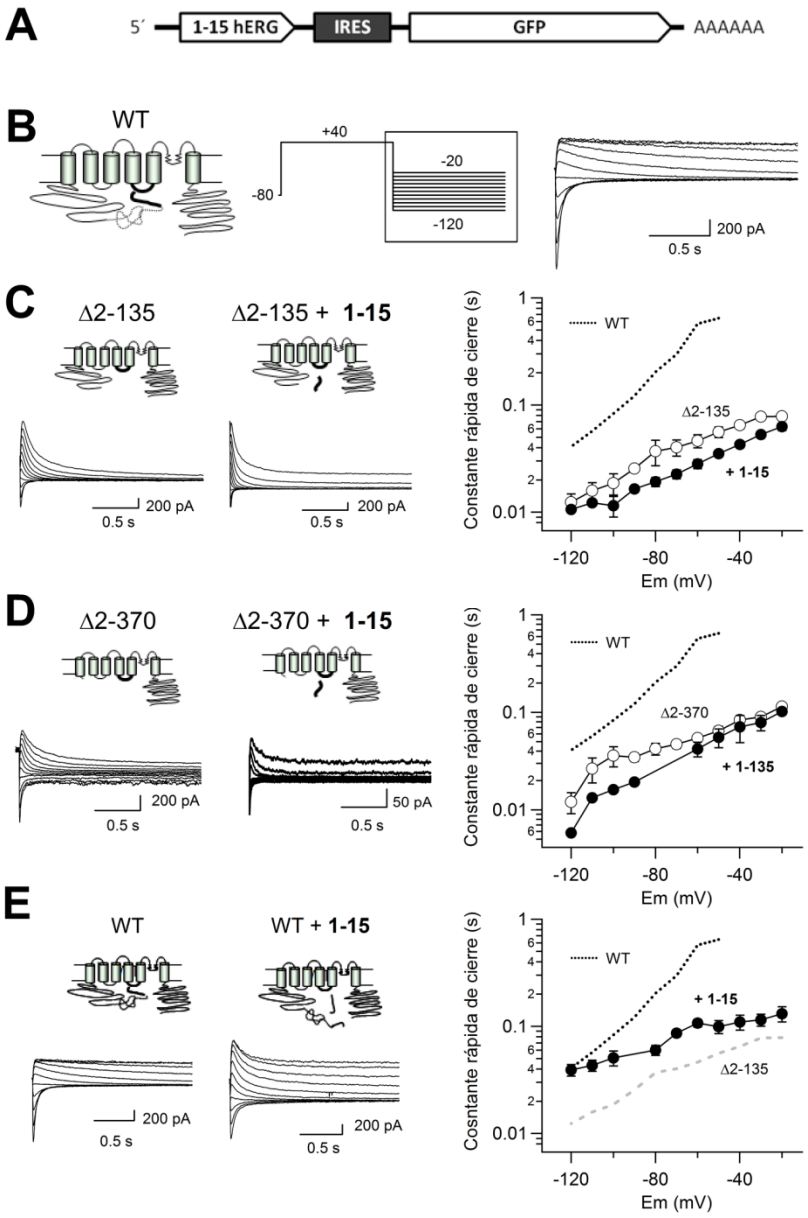


Figura 38. *Efecto del fragmento N1-15 codificado en un RNA bicistrónico sobre el cierre del canal hERG. A) Representación esquemática del RNA bicistrónico que contiene el fragmento N1-15 y GFP. B) Representación esquemática del canal hERG nativo (WT) y una familia de corrientes de cola representativas obtenidas con el protocolo indicado. C-D) La presencia del fragmento N1-15 no es capaz de ralentizar la cinética de cierre del canal hERG portando deleciones del dominio eag. En el lado izquierdo se muestran esquemas de los canales y familias de corrientes de cola representativas. A la derecha se muestran gráficas con las constantes rápidas de cierre a diferentes voltajes de repolarización. Los círculos blancos y negros representan los datos obtenidos en ausencia y en presencia del fragmento recombinante, respectivamente. El número de células estudiadas en ambas condiciones fue de 11 y 6 para el canal Δ2-135 y de 6 y 3 con el canal Δ2-370. E) El fragmento N1-15 compite con el dominio eag endógeno de los canales nativos, acelerando su cierre a voltajes a los que la desactivación procede de forma lenta. Los esquemas del canal con o sin fragmento y corrientes de cola representativas en ausencia y presencia de éste se muestran en la parte izquierda. A la derecha se muestran las constantes rápidas de cierre del canal nativo (WT) en ausencia (línea punteada) y presencia (círculos rellenos, n=9) del fragmento N1-15. Se muestran asimismo los datos de cierre correspondientes al canal truncado Δ2-135 (trazo gris discontínuo).*

DISCUSIÓN

La precisa repolariazación cardíaca así como la actividad eléctrica de ciertos tipos celulares dependen de un correcto funcionamiento del canal de potasio hERG (Curran *et al*. 1995; Sanguinetti *et al*. 1995; Spector *et al*. 1996b; Whitchel y Hancox 2000; Papa *et al*. 2003, Emmi *et al*. 2000). Como en otros canales de K^+ dependientes de voltaje, tanto el sensor de voltaje como los componentes de la maquinaria de apertura y cierre se encuentran localizados en la región transmembranal del canal. Sin embargo, como ya se ha comentado en la introducción, su lenta cinética de cierre depende de la parte inicial del extremo amino (Spector *et al*. 1996a; Morais-Cabral *et al*. 1998; Chen *et al*. 1999; Viloria *et al*. 2000; Wang *et al*. 1998, 2000), mientras que su activación así como la regulación hormonal de su apertura y cierre son moduladas por el dominio proximal también localizado en el extremo amino (Viloria *et al*. 2000; Gómez-Varela *et al*. 2002, 2003, Saenen *et al*. 2006). Por ello, el conocimiento de la arquitectura molecular de estas regiones citoplásmicas del canal, así como de sus posibles interacciones con otras regiones de la proteína, permitirá un mejor conocimiento del papel de hERG en el control del ritmo cardíaco y de otros procesos fisiológicos como la secreción hormonal y la proliferación y supervivencia de ciertas células tumorales (Sanguinetti *et al*. 1995; Smith *et al*. 1996; Zhou *et al*. 1998a; Emmi *et al*. 2000; Cherubini *et al*. 2000; Overholt *et al*. 2000; Rosati *et al*. 2000; Gómez-Varela *et al*. 2003).

1. ESTIMACIÓN MEDIANTE FRET DE DISTANCIAS RELATIVAS DE DISTINTAS ETIQUETAS INTRODUCIDAS EN hERG RESPECTO A LA MEMBRANA PLASMÁTICA.

La utilización de medidas de FRET entre pares de fluoróforos insertados en puntos concretos de una proteína huésped, puede servir para determinar, la arquitectura molecular de dicha proteína en condiciones fisiológicas y en el entorno natural correspondiente a la célula intacta. Datos previos de nuestro laboratorio (Miranda *et al*. 2008) han aportado una primera aproximación a la organización global de los extensos dominios citoplásmicos del canal hERG, así como algunos aspectos clave de la estructura del oligómero que constituye el canal. Sin embargo, un análisis más detallado de nuestros datos ha planteado cuestiones adicionales, algunas de las cuales se han abordado en el trabajo de esta tesis.

En primer lugar, consideramos la posible contribución a nuestros datos de FRET de canales localizados fuera de la membrana plasmática, que contribuyen a las señales fluorimétricas obtenidas en las condiciones de iluminación por epifluorescencia y que pudiesen afectar a las interpretaciones sobre la arquitectura molecular del canal *in vivo*. Por ello, la puesta a punto y utilización de un sistema de iluminación en condiciones de TIRF, nos

ha permitido restringir el estudio de las señales fluorimétricas de modo casi exclusivo a la zona de la membrana plasmática, excluyendo la señal de fluoróforos localizados en otras regiones. Esta selectividad de las señales ha sido puesta de manifiesto por nuestros resultados desmostrando la fotodestrucción exclusiva de los fluoróforos situados en las cercanías de la interfase vidrio-agua bajo las citadas condiciones de iluminación. Por otro lado, la puesta a punto de la combinación TIRF/FRET nos ha permitido constatar que no existen grandes diferencias en las estimaciones de FRET realizadas en condiciones de epifluorescencia o de TIRF. Aunque esta circunstancia parecería esperable en el caso de proteínas localizadas en la membrana plasmática, es sumamente relevante cuando se trata de una proteína como el canal hERG, cuya distribución subcelular no se restringe ni mucho menos a dicha membrana (Miranda *et al*. 2008, ver también Figura 26). Es posible que, incluso en este caso, la mayoría de las señales fluorimétricas que dan origen a los datos de FRET provengan de canales que, encontrándose en tránsito hacia o desde la membrana, estén correctamente ensamblados y con una estructura equivalente a la de los canales maduros y expuestos en superficie. En cualquier caso, los datos actuales son coherentes con los resultados previos en condiciones de epifluorescencia, en los que ya observamos niveles de FRET equivalentes cuando las medidas eran realizadas con la fluorescencia de la célula completa o cuando eran restringidas mediante software a aquellas regiones de la imagen correspondientes al contorno celular en el que se encuentra la membrana plasmática (Miranda *et al*. 2008).

Es interesante resaltar que si bien en principio la combinación TIRF/FRET podría parecer la metodología ideal para la cuantificación de los niveles de FRET en el caso de hERG, y que en general rinde valores de E_{FRET} ligeramente superiores, no está sin embargo exenta de ciertas limitaciones. Así, los problemas de fotoblanqueo y enfoque inherentes a la variante técnica del TIRF hacen complicado el seguimiento de la evolución temporal de la fluorescencia del donador y aceptor durante los experimentos de fotoblanqueo del aceptor. Esto limita la posibilidad de medida de los cambios de la fluorescencia del donador en función del tiempo de blanqueo del aceptor y la subsiguiente extrapolación de los incrementos en la intensidad de la fluorescencia del donador a un nivel de aceptor cero. De ahí la necesidad de alcanzar niveles de fotodestrucción del aceptor prácticamente totales para lo que es necesario combinar la irradiación con el láser y la procedente del monocromador para epifluorescencia. Asimismo, la reducida profundidad de campo del objetivo de TIRF obliga a la adquisición sistemática de imágenes sucesivas en distinto plano (“stacks”) que permitan compensar las variaciones de enfoque, particularmente en experimentos realizados a tiempos largos, agravando los

problemas de fotoblanqueo de los fluoróforos y con la consiguiente reducción de la resolución temporal del sistema.

En segundo lugar y en base a una serie de consideraciones indirectas, en nuestro modelo previo de la arquitectura molecular de las regiones citoplásmicas de hERG habíamos considerado como la opción más plausible que la proteína fluorescente insertada en el residuo 345 del canal se situase más próxima a la membrana, seguida a distancia creciente por las introducidas en las posiciones 1, 905 y 1158 (Miranda *et al*. 2008). Nótese sin embargo que puesto que nuestras medidas de FRET sólo reflejaban la distancia relativa entre los fluoróforos en esas posiciones, los datos serían igualmente compatibles con una organización de las estructuras citoplásmicas al revés de la propuesta, con el residuo 1158 más cercano y el 345 más alejado del cuerpo transmembranal del canal y por ende de la membrana. Desafortunadamente, la utilización como referencia de un fluoróforo insertado en una zona del canal embebida en la membrana, fue desestimada por el hecho de que todas las fusiones fluorescentes de hERG con los fluoróforos en esa región resultaron no funcionales. Consideramos que las distorsiones estructurales causadas por la inserción del fluoróforo desaconsejaban el uso de esas construcciones para las medidas estructurales. Como una alternativa, nos planteamos utilizar los colorantes aceptores $DiBAc_4(5)$ y DPA que se insertan en la membrana lipídica, para estimar las distancias relativas desde las proteínas fluorescentes insertadas en diferentes posiciones del canal a los citados colorantes, y por tanto a la membrana.

Como ya se ha comentado en el apartado de resultados, una complicación importante para el uso del $DiBAC_4(5)$ como un indicador de la distancia a la membrana fue que a pesar de que su traslocación entre las dos monocapas de la membrana inducida por cambios de potencial debería producirse de forma rapidísima (en ms, ver DiFranco *et al*. 2007), todas las respuestas fluorimétricas registradas utilizando $DiBAC_4(5)$ tenían lugar de forma sumamente lenta, en el rango de minutos. Esta escala temporal se corresponde con la reconocida capacidad de este tipo de colorantes para distribuirse de forma potenciométrica a ambos lados de la membrana en función del voltaje, lo que conlleva cambios lentos en su nivel de fluorescencia, aparentemente tras su interacción con proteínas u otros componentes intracelulares hidrofóbicos (González *et al*. 1999; Yamada *et al*. 2001). Esta circunstancia, unida al hecho de que el canal hERG presenta una distribución mayoritaria fuera de la membrana plasmática, hace muy difícil estimar en qué medida contribuyen subunidades del canal no ensambladas a los niveles de FRET. Por tanto, una interpretación de estos niveles como una indicación de distancia relativa a la membrana no parece ser correcta.

Por el contrario, mediante el empleo de la DPA como aceptor de FRET fuimos capaces de observar una respuesta fluorimétrica rápida que se correspondería con la translocación del colorante de una hemicapa de la membrana plasmática a otra en función del voltaje. Si bien en el caso de la fluorescencia asociada al canal hERG, quizá por su distribución subcelular, ya se observa una respuesta unas decenas de milisegundos tras la aplicación del pulso de voltaje, hemos sido capaces de aislar la respuesta rápida que debería corresponder a los elementos asociados a la membrana plasmática. Por tanto, estas rápidas variaciones del nivel de FRET en respuesta a los cambios de voltaje parecen ser un indicador fiable de la distancia relativa del donador de FRET a la membrana plasmática. Así, cuanto mayor sea la variación de FRET cuando se transloca la DPA en la membrana, menor será la distancia entre el donador fluorescente etiquetando la proteína del canal y dicha membrana.

Es importante matizar no obstante que si bien el empleo de la DPA puede permitirnos estimar las distancias relativas entre fluoróforos localizados en distintas posiciones del canal hERG y la membrana, este método también presenta una serie de peculiaridades técnicas que se consideran a continuación.

En primer lugar, la resolución temporal que pudimos conseguir con nuestro sistema de imagen, aunque suficiente para distinguir el componente rápido del lento de la respuesta de la DPA al voltaje, sigue siendo pequeña (≥72 ms) lo que complica la separación matemática de ambos componentes, siendo difícil establecer a partir de qué punto en el registro de fluorescencia desaparece el componente rápido. Por otra parte, para un ajuste exponencial más exacto del componente lento que, sería deseable que el pulso despolarizador durase lo suficiente como para que el aumento de FRET debido al movimiento lento de la DPA se estabilizase. Sin embargo, este proceso podría llevar varios minutos, impidiendo realizar varios pulsos en una misma célula con lo cual se podría perder el control adicional de cómo el aumento de FRET tras la aplicación de un pulso de voltaje es independiente del nivel de fluorescencia inicial. Además, la irradiación mantenida del fluoróforo necesaria para el registro continuo de la fluorescencia causaría una fotodestrucción completa de éste.

En segundo lugar debe tenerse en cuenta que la fluorescencia recogida durante los experimentos con DPA proviene de toda la célula, y por ello el nivel de FRET detectado debido a la traslocación rápida de la DPA podría ser infravalorado ya que dicha traslocación solo ocurre en la membrana plasmática. Por este motivo los niveles de FRET no pueden ser traducidos con seguridad a distancias absolutas, aunque si comparar las distancias relativas de los fluoróforos insertados en distintos puntos a la DPA y por tanto a la membrana. Por esa

misma causa, la comparación del nivel de FRET de Rho-pYC con el observado con las distintas construcciones de hERG no puede utilizarse tampoco en forma de distancia relativa, ya que el FRET del Rho-pYC corresponde a la fluorescencia de la membrana sin contaminación con la del interior celular, por lo que será infravalorado en mucha menor medida que el correspondiente a las variantes etiquetadas de hERG, que se distribuyen por toda la célula.

Pese a las consideraciones que acabamos de exponer, nuestros datos permiten comparar las distancias relativas con las distintas construcciones, y confirmar la orientación del modelo estructural de los dominios citoplásmicos previamente propuesto (Miranda *et al*. 2008). Así, el extremo amino estaría más cercano al cuerpo central del canal embebido en la membrana, y el carboxilo más alejado de ésta. Además, la comparación de las distintas distancias relativas de los residuos 1, 345, 905 y 1158 a la membrana, confirma el posicionamiento relativo entre ellos propuesto en base a las medidas previas de FRET y TIRF-FRET. Quizá la única ligera diferencia de nuestra interpretación actual respecto a los datos previos estaría en que de acuerdo a los datos incluidos en esta memoria, las posiciones 1 y 345 se localizarían a una distancia vertical de la membrana equivalente y no la posición 345 algo más cerca de la misma (Miranda *et al*. 2008). Esta pequeña discrepancia podría ser explicada teniendo en cuenta que mientras que las medidas de FRET y TIRF-FRET intrasubunitario fueron llevadas a cabo en células en reposo, los experimentos de FRET con la DPA se realizaron mediante saltos de voltaje de 240 mV haciendo pasar al canal de un estado cerrado a uno abierto/inactivo, un proceso durante el cual se esperan reorganizaciones conformacionales en la estructura del canal. De hecho, se ha indicado que durante esta transición el extremo amino parece alejarse del cuerpo central del canal (de la Peña *et al*. 2013), lo cual, unido a la flexibilidad del segmento inicial del amino, podría contribuir a que las posiciones 1 y 345 tendiesen a localizarse en el mismo plano.

2. RECONSTRUCCIÓN DE LAS PROPIEDADES FUNCIONALES DE hERG CON FRAGMENTOS RECOMBINANTES. MAPEO DE LOS DETERMINANTES MOLECULARES DE LA MODULACIÓN DEL CANAL POR DOMINIOS CITOPLÁSMICOS.

Tal como se ha comentado en la introducción, trabajos previos utilizando oocitos de *Xenopus* como sistema de expresión han permitido constatar que la microinyección del péptido correspondiente a todo el dominio eag, la aplicación directa de este péptido a macroparches de membrana y la expresión del dominio eag recombinante puede recuperar la

cinética de cierre normal de canales hERG en los que la delección completa del extremo amino provoca a una desactivación enormemente acelerada (Morais-Cabral *et al*. 1998; Wang *et al*. 2000; Gustina y Trudeau, 2009).

En este trabajo, utilizando células de mamífero transfectadas en lugar de oocitos, hemos podido demostrar que para conseguir que un fragmento eag recombinante sea capaz de revertir el cierre acelerado en canales con alteraciones estructurales en el amino, no es necesario eliminar la totalidad de dicho extremo, sino que dicha recuperación es observable igualmente con canales a los que se ha delecionado únicamente el fragmento correspondiente al fragmento eag que es añadido exógenamente (residuos 2-135). Incluso hemos podido ver que el fragmento recombinante es capaz de revertir una parte sustancial de la aceleración del cierre del canal causada por una mutación puntual al comienzo del amino, como es el caso del mutante V3C. El hecho de que en este caso no hayamos observado una recuperación completa podría deberse a que aunque la mutación altere la interacción del extremo amino con la maquinaria de cierre lo suficiente como para acelerar el cierre, este extremo permanecería cercano y podría entorpecer la interacción del dominio eag exógeno con el canal. Esta observación sería consistente con el hecho de que en los experimentos de TIRF-FRET se hayan obtenido unos valores de FRET ligeramente más bajos entre el fragmento recombinante y el canal mutante V3C, que en el caso del fragmento recombinante junto con el canal con los primeros 135 aminoácidos truncados.

Por otra parte, hemos comprobado que introduciendo la mutación Y542C en el lazo S4-S5 de un canal que presenta la deleción Δ2-135, el fragmento eag recombinante pierde su capacidad para recuperar la lenta cinética de cierre del canal y, asimismo, que en presencia de esta mutación no se observa FRET entre el canal y el fragmento recombinante. Este efecto es específico ya que la introducción de una mutación en la misma región a tan solo 4 residuos de distancia de la anterior (G546C), no tiene ningún efecto sobre la reconstrucción funcional (ralentización del cierre) del canal. Además en este caso se observa también un nivel máximo de FRET entre canal y fragmento. Debe hacerse notar que si bien el nivel de FRET entre moléculas etiquetadas con variantes de la GFP, debido al gran tamaño de éstas, no puede ser usado como un indicador de en qué punto concreto tienen lugar las interacciones entre ambas entidades, sino sólo como un mero criterio de proximidad, la existencia de una correlación entre los niveles de FRET y la reconstrucción funcional sugiere la existencia de una interacción entre el dominio eag y la región inicial del lazo S4-S5.

Dado que una mutación puntual tanto al comienzo del dominio eag como en la región inicial del lazo S4-S5 dificultan o bloquean la recuperación funcional causada por el dominio eag recombinante, estos dos datos apuntarían a que también en el caso de canales completos sin ninguna alteración, podría darse una interacción entre ambas regiones que regulase el fenómeno del cierre.

Los resultados obtenidos en los experimentos de reconstrucción funcional, apoyados por la proximidad detectada entre el dominio eag recombinante y el canal en los experimentos de TIRF-FRET, indican que la región inicial del dominio eag, una zona flexible y altamente desestructurada (Ng *et al*. 2011; Muskett *et al*. 2011; Li *et al*. 2010), tiene un papel clave en la lenta cinética de cierre de hERG mediante su interacción específica con otros dominios del canal como el lazo S4-S5. El que esta interacción ocurra a nivel de una zona flexible sería compatible con estudios que afirman que el desorden y la flexibilidad puede ayudar a la producción de interacciones rápidas a la vez que específicas (Uversky y Dunker 2010; Chouard 2011). También se ha descrito en canales tipo *Shaker*, que la región inicial desestructurada y flexible del extremo amino es un factor importante para que dicho extremo pueda alcanzar su sitio de interacción cerca del canal y producir inactivación tipo N (Gulbis *et al.*2000; Kobertz *et al*. 2000; Wissmann *et al*. 2003). Asimismo, los datos descritos en este trabajo apuntan al lazo S4-S5 como uno de los puntos de interacción del dominio eag y dicho lazo también presenta una flexibilidad que ha sido propuesta como esencial para la correcta modulación de la apertura y cierre de hERG (Van Slyke *et al*.2010).

Esta interpretación es totalmente consistente con los resultados de nuestro laboratorio demostrando que puede formarse un puente disulfuro entre el comienzo del extremo amino y el del lazo S4-S5 tras introducir una doble mutación a cisteína V3C + Y52C (de la Peña *et al*. 2011) y que ambas posiciones estén a menos de 6 Å de distancia. Sin embargo, mientras que los resultados del presente trabajo sugieren que la interacción entre estas regiones debería ocurrir en el estado abierto del canal ya que conlleva la ralentización del cierre, la formación de los puentes disfulfuro se produce preferentemente en estado cerrado. Una interacción en estado cerrado sería igualmente compatible con nuestras observaciones previas de que i) la región inicial del extremo amino es capaz de afectar a las propiedades de apertura, y ii) que la mutación Y542C causa un desplazamiento de la $V_{0.5}$ de activación hacia voltajes más positivos y hace la ΔG_0 más negativa, desplazando el equilibrio del canal hacia el estado cerrado (Alonso-Ron *et al*. 2008). Es posible que aunque existan pequeñas diferencias en la posición del extremo amino en los estados conformacionales abierto y cerrado, dicho extremo podría estar localizado en ambos casos próximo al lazo S4-S5. Por último, resultados recientes del

laboratorio indican que esta interacción es una parte esencial de una red mayor de interacciones modulada dinámicamente durante la transición entre los estados abierto y cerrado del canal y en la que estarían también involucrados los dominios PAS del amino y cNBD del carboxilo (de la Peña *et al*. 2011, 2013).

Las consideraciones expuestas no excluyen la existencia de otros sitios de interacción, ya sea entre los propios dominios citoplásmicos o entre éstos y la región transmembranal, que contribuyan a la modulación de la apertura y cierre de hERG. Así, podrían darse interacciones inter o intrasubnunitarias del dominio PAS y la hélice α anfipática correspondiente a los residuos 13 a 23, con el dominio CNBD en la región carboxiloterminal (Ng *et al*. 2011, Muskett *et al*. 2011; Gustina y Trudeau 2011). Por otra parte, estas dos regiones también podrían interactuar con el propio lazo S4-S5 favoreciendo un posicionamiento adecuado de la región inicial desestructurada del extremo amino para su interacción con la maquinaria de apertura y cierre (Ng *et al*. 2011). De hecho, tanto el domino eag completo, como el PAS y el CNBD parecen ser necesarios pero no suficientes para mantener la lenta cinética de cierre del canal (Ng *et al*. 2011; Muskett *et al*. 2011; Gustina y Trudeau 2011). Sin embargo, la región inicial del extremo amino tendría un papel crucial en la regulación del cierre de hERG, ya que aún en ausencia de otras alteraciones estructurales, pequeños cambios en esta zona como son la mutación V3C o la deleción Δ2-9 (Ng *et al*. 2011) afectan de un modo importante al proceso de cierre, de forma muy similar a lo que ocurre con la deleción del extremo amino completo de la proteína. Además, el péptido correspondiente a los residuos 1-15 si bien no es capaz de sustituir la funcionalidad de todo el dominio eag en canales truncados, puede competir con la maquinaria endógena, acelerando el cierre en canales nativos a aquellos voltajes en los que este cierre es aún considerablemente lento.

Un aspecto a tener en cuenta de los resultados presentados es que la deleción Δ2-135 además de acelerar el cierre produce un desplazamiento en la dependencia de voltaje de apertura del canal hacia potenciales más positivos. Sin embargo, al contrario de lo que ocurre con el cierre, este desplazamiento no se revierte en presencia del fragmento eag recombinante. Esto sugiere que el extremo amino influye en el proceso de apertura por un mecanismo diferente que en el cierre. En este mecanismo podrían participar además del dominio amino terminal y el lazo S4-S5, la región del C-linker/CNBD. Así, la zona inicial del amino podría alterar la influencia electrostática de un grupo de aminoácidos cercanos al primer segmento transmembranal S1 sobre el lazo S4-S5 (Viloria *et al*. 2000; Saenen *et al*. 2006). De hecho, ya se ha descrito que esta influencia podría depender de una orientación adecuada de los primeros 16 aminoácidos del dominio eag respecto al lazo S4-S5 (Alonso-Ron

et al. 2008). Sin embargo, aún en ausencia de ese grupo de aminoácidos, sigue teniendo lugar la regulación hormonal de la apertura del canal, que depende de la presencia de un extremo amino intacto (Alonso-Ron *et al*. 2009). Por otra parte, también se ha descrito una posible influencia del dominio CNBD sobre la activación del canal independiente de su influencia sobre el cierre y que dicha influencia podría no necesitar ninguna interacción con el dominio PAS del amino (Gustina y Trudeau 2011).

Así pues, considerando los resultados obtenidos en este trabajo y otros datos anteriores (Ng *et al*. 2011; Muskett *et al*. 2011; Li *et al*. 2010; de la Peña *et al*. 2011; Gustina y Trudeau 2009; 2011, 2013), podemos sugerir que la región inicial desestructurada y flexible (residuos 1-13) del dominio amino terminal sería responsable de la modulación del cierre de hERG mediante su interacción con la región inicial del lazo S4-S5, actuando la hélice α anfipática y el dominio PAS que la siguen como un armazón y espaciador que permita una correcta orientación de estos residuos iniciales respecto al cuerpo central del canal. Si en el caso de hERG las regiones carboxilo terminales C-linker/CNBD colgasen centralmente bajo el cuerpo central del canal, tal como ocurre en el canal HCN2 (Zagotta *et al*. 2003), podrían permitir contactos en sus superficies superiores y laterales con los dominos eag que se encontrarían situados más periféricamente (Miranda *et al*. 2008). Esto también ayudaría a posicionar al dominio PAS y a la hélice α anfipática de modo que pudiesen influir en el proceso de apertura y cierre, ya sea también a nivel del lazo S4-S5, o bien alostéricamente mediante su interacción con las estructuras de la región carboxilo terminal (Muskett *et al*. 2011, Gustina y Trudeau 2011), que cuales están directamente unidas a la compuerta del canal localizada al final de la hélice transmembranal S6.

En su conjunto, nuestros datos contribuyen pues a reforzar nuestra idea previa de que las interacciones físicas entre algunos dominios citoplásmicos de hERG juegan un papel clave en los procesos de apertura y cierre del canal (de la Peña *et al*. 2011, 2013). No obstante, serán necesarios trabajos adicionales para entender en mayor detalle las reorganizaciones conformacionales y variaciones dinámicas asociadas al funcionamiento del canal.

3. RELACIÓN ENTRE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN NUESTRO TRABAJO Y LOS DATOS RECIENTES DE OTROS AUTORES.

La base molecular de la regulación de la activación y, particularmente, del cierre de los canales de la familia eag (incluído hERG), ha sido objeto de un intenso estudio en diferentes laboratorios. Se han propuesto dos hipótesis, que en algunos casos se han llegado a considerar

mutuamente excluyentes (Gustina y Trudeau 2012; Haitin *et al.* 2013), para explicar el papel modulador del dominio eag sobre la funcionalidad de estos canales:

a) Una interacción del eag, probablemente de su región inicial (residuos 1-9 y/o 9-26) con el lazo S4-S5, que regularía de modo directo el propio movimiento del sensor de voltaje (fundamentalmente la hélice S4) y/o el acoplamiento de éste a la compuerta del canal en la parte inferior de la hélice S6. Datos en apoyo de esta hipótesis incluirían el hecho de que mutaciones puntuales en el S4-S5 dan lugar a canales con cinéticas de cierre aceleradas, similares a las observadas tras la alteración del extremo amino (Wang *et al.* 1998; Sanguinetti y Xu 1999; Wang *et al.* 2000; Alonso-Ron *et al*. 2008; Ng *et al*. 2011). Por otro lado, en nuestro laboratorio hemos demostrado la existencia de una proximidad física entre el segmento inicial del extremo amino y el lazo S4-S5, ya que se puede establecer un puente disulfuro entre estos dos dominios intracelulares portando dos cisteínas, (de la Peña *et al*. 2011, 2013). También ha sido demostrada la unión al dominio eag aislado a un nonapéptido correspondiente al lazo S4-S5, mediante estudios de titulación por NMR (Li *et al*. 2010). No obstante, en este caso sólo fueron utilizados fragmentos proteicos aislados, y la especificidad de los péptidos empleados no fue comprobada. De hecho, datos preliminares de nuestro grupo en colaboración con el del Dr. Oscar Millet del instituto BioGUNE de Vizcaya, sugieren que el dominio eag/PAS recombinante aislado puede interaccionar con otros péptidos cuya secuencia no corresponde al citado lazo S4-S5. Por último, los datos descritos en el presente trabajo, indican que la recuperación de la lenta cinética de cierre en presencia de los fragmentos recombinantes correspondientes al dominio eag, es anulada tras la introducción de mutaciones puntuales en la región inicial del citado dominio o en el lazo S4-S5, de nuevo apuntando a la existencia de una interacción entre ambas regiones.

b) Una interacción del eag, principalmente de la región PAS del mismo, con la región "C-linker"/cNBD del carboxilo terminal. Los datos que favorecen esta interpretación incluyen la constatación de que ciertas mutaciones en la región cNBD son capaces de acelerar parcialmente el cierre de hERG, y de que canales con una deleción del cNBD presentan rápidas cinéticas de cierre, similares a las observadas en los canales truncados en su extremo amino (Al Owais *et al*. 2009; Gustina y Trudeau 2011; Muskett *et al*. 2011). Por otro lado, se ha detectado una asociación del dominio eag aislado con los dominios C-terminales de hERG mediante ensayos de "affinity pull-down" (Gustina y Trudeau 2011). Asimismo, mediante modelado molecular de los dominios eag y "C-linker"/cNBD seguido de estudios de acoplamiento teórico ("docking") entre ambos y mutagénesis de los hipotéticos puntos de contacto, también se ha inferido una asociación del segmento eag a la parte más distal del

cNBD (Muskett *et al*. 2011). Una limitación de estos estudios radica en el hecho de que segmentos proteicos aislados que no contactan en el entorno de un canal intacto en la membrana, pueden interaccionar entre sí cuando se encuentran en solución. Así, nuestros estudios preliminares de "docking" informático utilizando las 20 estructuras del dominio eag de hERG obtenidas por NMR (códigos PDB 2L4R, 2L0W y 2L1M) y la estructura cristalina del "C-linker"/cNBD del canal HCN2 (código PDB 1Q50), indican que la posición idónea de acoplamiento entre ambos varía drásticamente si se utiliza un fragmento "C-linker"/cNBD aislado o un tetrámero de éste. Además, la flexibilidad intrínseca de la región inicial del dominio eag, permite que su localización varíe en el conjunto de las citadas 20 estructuras desde la zona distal del cNBD hasta el "C-linker" situado en el extremo opuesto de dicho cNBD y directamente en contacto con el cuerpo transmembranal del canal.

Por último, en dos publicaciones recientes se ha indicado que el dominio eag interacciona directamente con el cNBD y que por ello i) el lazo S4-S5 no es suficiente para la interacción del eag con el resto del canal (Gianulis *et al*. 2013), e ii) que de acuerdo con su posicionamiento en un complejo cristalográfico eag/cNBD (Haitin *et al*. 2013), el dominio eag sólo interacciona con el cNBD, ejerciendo sus efectos funcionales exclusivamente a través de dicha interacción. Esto parece contradecir algunas de las conclusiones aportadas en el presente trabajo y, en particular, la relevancia del lazo S4-S5 y de sus interacción con el inicio del extremo amino, para la modulación de la apertura y/o el cierre de hERG. Sin embargo, resulta conveniente considerar algunas particularidades de dichos estudios:

En primer lugar, el posicionamiento del dominio eag en el complejo cristalino eag/cNBD de Haitin et al, ha sido obtenido utilizando un dominio eag carente de los 16 ó 26 residuos iniciales de su N-terminal. Por otro lado y quizá más importante, sólo las dos últimas hélices del "C-linker" fueron incluídas en el péptido correspondiente al "C-linker"/cNBD, por lo que la mayoría del “C-linker” no está presente en el complejo. Dado que la tetramerización del dominio "C-linker"/cNBD depende de la interacción entre las hélices del "C-linker", esta ausencia es probablemente la causa de que en la estructura del complejo (código PDB 4LOO) dos de los dominios "C-linker"/cNBD miran hacia la parte superior y los otros dos en dirección contraria. Esto conlleva que la organización estructural del complejo diste bastante de la observada anteriormente en los "C-linker"/cNBD de los canales HCN2 de ratón (cristalizados como tetrámeros; Zagotta *et al*. 2003), de los canales ELK de pez cebra (cristalizados como dímeros; Brelidze *et al*. 2012) y de agERG de mosquito (cristalizados como monómeros; Brelidze *et al*. 2013). Nótese asimismo, que las estructuras reportadas corresponden al canal eag1 (KCNH1) de ratón y no a las equivalentes de hERG (hERG1 ó KCNH2). Por último, a pesar

de la enorme contribución de las estructuras cristalinas al conocimiento de la organización de los canales iónicos, sólo aportan una imagen estática de una única conformación proteica, dificultando asimismo la asignación de la estructura a uno o más estados funcionales de la proteína, máxime de regiones o dominios de la misma sujetos a considerables variaciones dinámicas como el propio "C-linker" de canales de la familia KCNH como hERG (Brelidze *et al.* 2013).

En segundo lugar, los resultados recogidos por Gianulis *et al.*, fueron obtenidos utilizando la variante no inactivante de hERG S620T, que aún eliminando la inactivación del canal, se espera que no altere significativamente la modulación mediada por el dominio eag, mejorando sin embargo notablemente los niveles de corriente iónica registrados. De hecho, en contraste con las corrientes de sólo unos cientos de pA observados en nuestros experimentos, dichos niveles alcanzan sistemáticamente alrededor de una decena de nA en los experimentos ilustrados en Gianulis *et al*. (2013). Esta circunstancia podría explicar algunas de las diferencias en los parámetros electrofisiológicos descritos en ambos trabajos, y podría dar lugar a variaciones en los niveles de FRET reportados en ambos casos si la mayor sobre-expresión de los canales etiquetados propiciase encuentros aleatorios entre ellas, maximizando los niveles de FRET. Otras diferencias incluyen el tipo de mutación no a cisteína sino a alanina (Gianulis *et al*. 2013), el etiquetado fluorescente de los dominios eag recombinantes y de los canales hERG con variantes distintas de GFP y la evaluación de los niveles de FRET. Así, en nuestro caso la evaluación de los niveles de FRET fue realizada mediante fotoblanqueamiento del aceptor y subsiguiente registro de los incrementos en la fluorescencia del donador bajo condiciones de TIRF, en tanto que en las medidas de Gianulis et al se utilizó un sistema de "spectra FRET", basado en el registro de la señal de fluorescencia espectral del aceptor combinando un microscopio de epifluorescencia convencional con un espectrógrafo de emisión. El impacto de estas variantes metodológicas en los resultados obtenidos es difícil de evaluar, no resultando fácil discernir si las variaciones en el sistema experimental podrían justificar las considerables diferencias entre ambos estudios, particularmente en casos como los correspondientes a las mutaciones en el residuo Y542 del S4-S5. Nótese no obstante, que en un comentario editorial reciente se ha especulado con la posibilidad de que nuestros datos pudiesen estar influidos por el hecho de haber cuantificado los niveles de FRET "a partir de la fluorescencia de un donador (CFP) unido a los dominios eag solubles, y por ello en condiciones de no saturación del aceptor (YFP) anclado al canal insertado en la membrana" (Zheng 2013). Evidentemente esta interpretación es totalmente errónea, dado que como se ha reiterado tanto a lo largo de esta memoria como en una publicación precedente (Fernández-Trillo *et al.* 2011), en nuestros

experimentos es el canal localizado en la membrana plasmática, el que porta el donador (CFP) cuyos incrementos en fluorescencia son evaluados como indicativos de FRET. Por su parte, en nuestro caso es el aceptor (YFP) unido al fragmento eag recombinante la especie molecular saturante. Como ha sido ampliamente documentado en la literatura, a diferencia de las condiciones para la realización del "spectra FRET" o de otros métodos basados en la medida de la emisión incrementada del aceptor (que requieren una elevada relación $F_{donador}/F_{aceptor}$ para una adecuada cuantificación de la eficiencia de FRET; ver Erikson *et al*. 2001; Cheng *et al*. 2007; Zheng 2013), en el caso de un sistema basado en la recuperación de la fluorescencia del donador tras blanquear el aceptor, ha de ser el nivel del aceptor (e.g la YFP etiquetando los fragmentos recombinantes) el que ha de aparecer en cantidades saturantes antes de su fotodestrucción a fin de evitar que un bajo nivel de relación molar aceptor/donador pueda dar lugar a una reducida e incontrolada señal de FRET (Erikson *et al*. 2001; Amiri *et al.* 2003; Zal Y Gascoigne 2004; Takanishi *et al.* 2006; Miranda *et al.* 2008).

Es interesante comentar que una discrepancia similar a la que acabamos de describir ha sido obtenida previamente en experimentos realizados con los canales TRPV1/3, con los que el método de fotoblanqueamiento rendía niveles mínimos de FRET (Hellwig *et al.* 2005), a diferencia de los elevados valores de FRET obtenidos mediante "spectra FRET" (Cheng *et al*. 2007). Si bien en este caso se ha llegado a concluir que la razón más probable de las diferencias podría estar en la utilización de la fluorescencia celular total (Hellwig *et al*. 2005) o bien de la fluorescencia de tan sólo la membrana (Cheng *et al*. 2007), no parece que tal circunstancia explique las diferencias entre nuestro estudio y el de Gianulis *et al*, ya que nuestros datos fueron obtenidos en condiciones de TIRF y por ello correspondiendo mayoritariamente a los canales localizados en la membrana plasmática. Es probable pues que las diferencias en el diseño experimental utilizado en las medidas de FRET pueda contribuir de forma importante a las discrepancias observadas en los distintos estudios.

CONCLUSIONES

1- La iluminación mediante TIRF de proteínas como hERG, TRH-R o Rho-pYC fusionadas a variantes fluorescentes de la GFP, permite detectar de modo selectivo los fluoróforos localizados mayoritariamente en la membrana plasmática.

2- La comparación de los niveles de FRET obtenidos con distintas fusiones fluorescentes de hERG tanto mediante la combinación TIRF/FRET como en condiciones de epifluorescencia a partir de señales procedentes de la célula completa, indica que los datos obtenidos con epifluorescencia no están significativamente alterados por canales hERG localizados fuera de la membrana plasmática.

3- La correspondencia cuantitativa entre las estimaciones de FRET en condiciones de TIRF y de epifluorescencia aporta una validación adicional al modelo estructural global elaborado previamente en función de la posición relativa de los fluoróforos insertados en las posiciones 1, 345, 905 y 1158 de hERG.

4- El grado de atenuación dependiente de voltaje y mediante FRET de la señal de fluoróforos como la CFP y la YFP insertados en distintas posiciones de una proteína de membrana, mediante el aceptor DPA que se inserta en la bicapa lipídica, permite una estimación de la distancia relativa del fluoróforo a la membrana plasmática y como una indicación de la separación de los dominios proteicos que portan el fluoróforo respecto a la superficie de membrana.

5- La cuantificación de la atenuación por la DPA de la fluorescencia de fluoróforos introducidos en distintos puntos de la secuencia de hERG demuestra que las posiciones 1 y 345 del canal se sitúan más próximas y las 905 y 1158 más alejadas de la superficie de la membrana plasmática.

6- En células de mamífero, la coeexpresión de canales hERG con alteraciones estructurales en el extremo amino junto con los fragmentos recombinantes portando secuencias de dicho extremo, ocasiona la recuperación funcional de las cinéticas normales de cierre del canal. La deleción del dominio *eag* del canal es suficiente para que un fragmento recombinante conteniendo dicho dominio sea capaz de producir una recuperación funcional del canal, no siendo necesaria la deleción total del extremo amino.

7- La introducción de mutaciones puntuales tanto el dominio *eag* recombinante como en el lazo S4-S5 del canal hERG, anulan la capacidad de dicho dominio para recuperar la funcionalidad de canales con alteraciones estructurales en su extremo amino y minimizan el nivel de FRET entre el fragmento recombinante y el canal etiquetado con proteínas fluorescentes. De manera consistente, esto indica que el extremo amino interacciona con el cuerpo central del canal a nivel del lazo intracelular S4-S5.

REFERENCIAS

Abbot, G.W., Sesti, F., Splawski, I., Buck, M.E., Lehmann, M.H., Timothy, K.W., Keating, M.T., Goldstein, S.A.N. (1999). *"MiRP1 forms I_{Kr} potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhytmia".* Cell. **97:** 175-87.

Alonso-Ron, C., de la Peña, P., Miranda, P., Domínguez, P., Barros, F. (2008). *"Thermodynamic and kinetic properties of amino-terminal and S4-S5 loop HERG channel mutants under steady-state conditions".* Biophys. J. **94:** 3893-3911.

Alonso-Ron, C., Narros, F., Manso, D.G., Gómez-Varela, D., Miranda, P., Carretero, L., Domínguez, P., de la Peña, P. (2009). *"Participation of HERG channel cytoplasmic structures on regulation by the G protein-coupled TRH receptor".* Plfügers Arch. **457:** 1237-1252.

Al-Owais, M., Bracey, K., Wray, D. (2009). *"Role of intracellular domains in the function of the hERG potassium channel".* Eur. Biophys. J. **38:** 569-576.

Amiri, H., Schultz, G., Schaefer, M. (2003). *"FRET-based analysis of TRPC subunit stoichiometry".* Cell Calcium. **33:** 463-70.

Arcangeli, A., Becchetti, A., Mannini, A., Mugnai, G., de Filippi, P., Tarone, G., del Bene, M.R., Barletta, E., Wanke, E., Olivotto, M. (1993). *"Intrgrin-mediated neurite outgrowth in neuroblastoma cells depends on the activation of potassium channels".* J. Cell. Biol. **122:** 1131-43.

Arcangeli, A., Bianchi, L., Becchetti, A., Faravelli, L., Coronnello, M., Mini, E., Olivotto, M., Wanke, E. (1995). *"A novel inward-rectifying K^+ current with a cell-cycle dependence governs the resting potential of mammalian neuroblastoma cells".* J. Physiol. **489:** 455-71.

Arcangeli, A., Rosati, B., Cherubini, A., Crociani, O., Fontana, L., Ziller, C., Wanke, E., Olivotto, M. (1997). *"HERG- and IRK-like inward rectifyer current are sequentially expressed during neuronal development of neural crest cells and their derivatives".* Eur. J. Neurosci. **9:** 2596-604.

Arcangeli, A. (2005). *"Expression and role of hERG channels in cáncer cells".* Novartis Foundation Symposium. **266:** 225-234.

Axelrod, D. (2003). *"Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy in Cell Biology".* Meth. Enzymol. **361:** 1-33.

Arcangeli, A., Becchetti, A. (2006). *"Complex functional interaction between integrin receptors and ion channels".* Trends. Cell. Biol. **16:** 631-639.

Bal, M., Zaika, O., Martin, P., Shapiro, M.S. (2008). *"Calmodulin binding to M-type K+ channels assayed by TIRF/FRET in living cells".* J. Physiol. **586:** 2307-20.

Barhanin, J., Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Lazdunski, M., Romey, G. (1996). *"KvLQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I_{Ks} cardiac potassium current".* Nature. **384:** 78-80.

Barros, F., Delgado, L.M., del Camino, D., de la Peña, P. (1992). *"Characteristics and modulation by thyrotropin-releasing hormone of an inwardly rectifying K^+ current in patch-perforated GH_3 anterioir pituitary cells".* Pflügers Arch. **422:** 31-39.

Barros, F., Villalobos, C., García-Sancho, J., del Camino, D., de la Peña, P. (1994). *"The role of the inwardly rectifying K^+ current in resting potential and thyrotropin-releasing hormone-induced changes in cell excitability of GH_3 rat anterior pituitary cells".* Pflügers Arch. **426:** 221-30.

Barros, F., Domínguez, P., de la Peña, P. (2012). *"Cytoplasmic domains and voltaje-dependent potassium cannel gating".* Front. Pharmacol. **3:**49.

Bauer, C.K., Engeland, B., Wulfser, I., Ludwig, J., Pongs, O., Schwarz, J.R. (1998). *"RERG is a molecular correlate of the inward-rectifying K^+current in clonal rat pituitary cells".* Receptor Channels. **6:** 19-29.

Bauer, C.K., Schäfer, R., Schiedmann, D., Reid, G., Hanganu, I., Schwarz, J.R. (1999). *"A functional role of the erg-like inward rectifying K^+ current in prolactin secretion from rat lactotrophs".* Mol. Cell. Endocrinol. **148:** 37-45.

Bauer, C.K., Wulfsen, I., Schäfer, R., Glassmeier, G., Wimmers, S., Flitsch, J., Ludecke, D.K., Schwarz, J.R. (2003). *"HERG K^+ currents in human prolactin-secreting adenoma cells"*. Pflügers Arch. **445 :**589-600.

Brelidze, T.I., Carlson, A.E., Sankaran, B, Zagotta, W.N. (2012). *"Structure of the carboxy-terminal región of a KCNH channel".* Nature. **481:** 530-3.

Brelidze, T.I., Gianulis, E.C., DiMaio, F., Trudeau, M.C., Zagotta, W.N. (2013). *"Structure of C-terminal región of an ERG channel and functional implications".* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **110:** 11648-53.

Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., Prasher, D.C. (1994). *"Green fluorescent protein as a marker for gene expression".* Science. **263(5148):** 802-5.

Chen, J., Zou, A., Splawski, I., Keating, M.T., Sanguinetti, M.C. (1999). *"Long QT síndrome-associated mutations in the Per-Arnt-sim (PAS) domain of HERG potassium channels accelerate deactivation".* J. Biol. Chem. **274:** 10113-18.

Cheng, Y.M., Claydon, T.W. (2012). *"Voltage-dependent gating of hERG potassium channels".* Front. Pharmacol. **3:** 83.

Cherubini, A., Taddel, G.L., Crociani, O., Paglierani, M., Buccoliero, A.M., Fontana, L., Noci, I., Borri, P., Borrani, E., Giachi, M., Becchetti, A., Rosati, B., Wanke, E., Olivotto, M., Arcangeli, A. (2000). *"HERG potassium channels are more frequently expressed in human endometrial cancer as compared to non-cancerous endometrium".* Br. J. Cancer. **83:** 1722-1729.

Chen, H., Puhl, H.L. 3rd, Koushik, S.V., vogel, S.s., Ikeda, S.R. (2006). *"Measurement of FRET efficiency and ratio of donor to aceptor concentration in living cells".* Biophys. J. L39-L41.

Cheng, W., Yang, F., Takanishi, C.L., Zheng, J. (2007). *"Thermosensitive TRPV channel subunits coassemble into heteromeric channels with intermédiate conductance and gating properties".* J. Gen. Physiol. **129:** 191-207.

Chiesa, N., Rosati, B., Arcangeli, A., Olivotto, M., Wanke, E. (1997). *"A novel role for HERG K^+ channels: spike-frequency adaptation".* J. Physiol. **501:** 313-18.

Chouard, T. (2011). *"Structural biology: Breaking the protein rules".* Nature. **471:** 151-3.

Chudakov, D.M., Lukyanov, S., Lukyanov, K.A. (2005). *"Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imaging".* Trends. Biotechnol. **23:** 605-13.

Clegg, R.M. (1992). *"Fluorescence energy transfer and nucleic acids".* Meth. Enzymol. **211:** 353-88.

Cody, C.W., Prasher, D.C., Westler, W.M., Prendergast, F.G., Ward, W.W. (1993). *"Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the Aequorea green fluorescent protein".* Biochemistry. **32(5):** 1212-8.

Corrette, B.J., Bauer, C.K., Schwarz, J.R. (1995). *"The electrophysiology of neuroendocrine cells".* En: Electrophysiology of neuroendocrine cells. Eds.: Hescheler, J. & Scherüb. CRC Press Inc. Pp 101-143.

Curran, M.E., Splawski, I., Timothy, K.W., Vincent, G.M., Green, E.D., Keating, M.T. (1995). *"A molecular basis for cardiac arrhytmia: HERG mutations cause long QT síndrome".* Cell. **80:** 795-804.

Daelemans, D., Costes, S.V., Cho, E.H., Erwin-Cohen, R.A., Lockett, S., Pavlakis, G.N. (2004). *"In vivo HIV-1 Rev multimerization in the nucleolus and cytoplasm by fluorescence resonance energy transfer".* J.Biol. Chem. **279:** 50167-75.

Day, R.N., Schaufele, F. (2005). *"Imagin molecular interactions in living cells".* Mol. Endocrinol. **19:** 1675-86.

De la Peña, P., Alonso-Ron, C., Machín, A., Fernández-Trillo, J., Carretero, L., Domínguez, P., Barros, F. (2011). *"Demonstration of physical proximity between the amino terminus and the S4-S5 linker of the hERG potassium channel".* J. Biol. Chem. **286:** 19065-19075.

De la Peña, P., Machín, A., Fernández-Trillo, J., Domínguez, P., Barros, F. (2013). *"Mapping of interactions between the N- and C- termini and the channel core in HERG K^+ channels".* Biochem. J. **451:** 463-474.

DiFranco, M., Capote, J., Quiñonez, M., Vergara, J.L. (2007). *"Voltage-dependent dynamic FRET signals from the transverse tubules in mammalian skeletal fibers".* J. Gen. Physiol. **130:** 581-600.

Dos Remedios, C.G., Moens, P.D.J. (1995). *"Fluorescence resonance energy transfer spectroscopy is a reliable "ruler" for measuring structural changes un proteins".* J. Struct. Biol. **115:** 175-85.

Downie, B.R., Sánchez, A., Knötgen, H., Contreras-Jurado, C., Gymnopoulos, M., Weber, C., Stühmer, W., Pardo, L.A. (2008). *"Eag1 expression interferes with hipoxia homeostasis and induces angiogenesis in tumors".* Journal of Biol. Chem. **283:** 36234-36240.

Elangovan,M., Walrabe, H., Chen, Y., Day, R.N., Barroso, M., Perisamy, A. (2003). *"Characterization of one- and two-photon excitation fluorescence energy transfer microscopy".* Methods. **29:** 58-73.

Ellenberg, J., Lippincott-Schwartz, J., Presley, J.F. (1999). *"Dual-colour imaging with GFP variants".* Trends. Cell. Biol. **9:** 52-6.

Emmi, A., Wenzel, H.J., Schwartzkroin, P.A., Taglialatela, M., Castaldo, P., Bianchi, L., Nerbonne, J., Robertson, G.A., Janigro, D. (2000). *"Do glia have heart? Expression and functional role for ether-a-go-go current in hippocampal astrocytes".* J. Neurosci. **20:** 3915-25.

Erickson, M.G., Alseikhan, B.A., Peterson, B.Z., Yue, D.T. (2001). *"Preassociation of calmodulin with voltage-gated Ca(2+) channels revealed by FRET in single living cells".* Neuron. **31:** 973-85.

Favarelli, I., Arcangeli, A., Olivotto, M., Wanke, E. (1996). *"A HERG-like K^+ channel in rat F-11 DRG cell line: pharmacological identification and biophysical charcterization".* J. Physiol. **496:** 13-23.

Felipe, A., Vicente, R., Villalonga, N., Roura-Ferrer, M., Martínez-Mármol, R., Solé, L., Ferreres, J.C., Condom, E. (2006). *"Potassium channels: New targets in cáncer therapy".* Cancer detection and prevention. **30:** 375-385.

Fernández-Trillo, J., Barros, F., Machín, A., Carretero, L., Domínguez, P., de la Peña, P. (2011). *"Molecular determinants of interactions between the N-terminal domain and the transmembrane core that modulate hERG K^+ channel gating".* PLoS ONE. **6:** e2467.

Fisher, J.A., Girdler, G., Khakh, B.S. (2004). *"Time-resolved measurement of state-specific P2X2 ion channel cytosolic gating motion".* J. Neurosci. **24:** 10475-87.

Fowler, C.E., Aryal, P., Suen, K.F., Slesinger, P.A. (2007). *"Evidence for association of GABA(B) receptor with Kir3 channels and regulator of G-protein signalling(RGS4) proteins".* J.Physiol (Lond.) **580:** 51-65.

Gianulis, E.C., Liu, Q., Trudeau, M.C. (2013). *"Direct interaction of eag domains and cyclic nucleotide-binding homology domains regulate deactivation gating in hERG channels".* J. Gen. Physiol. **142:** 351-66.

Giraldez, T., Hughes, T.E., Sigworth, F.J. (2005). *"Generation of functional fluorescent BK channels by random insertion of GFP variants".* J. Gen. Physiol. **126:** 429-38.

Gómez-Varela, D., de la Peña, P., García, J., Giráldez, T., Barros, F. (2002). *Influence of amino-terminal structures on kinetic transitions between several closed and open states in human erg K^+ channels".* J. Membrane Biol. **187:** 117-33.

Gómez-Varela, D., Barros, F., Viloria, C.G., Giráldez, T., Manso, D.G., Dupuy, S.G., Miranda, P., de la Peña, P. (2003). *"Relevance of the proximal domain in the amino-terminus of HERG channels for regulation by a phospholipase C-coupled hormone receptor".* FEBS Lett. **535:** 125-30.

González, J.E., Oades, K., Leychkis, Y., Harootunian, A., Negulesku, P.A. (1999). *"Cell-based assays and instrumentation for screening ion-channel targets".* Drug Discovery Today. **4:** 431-439.

Gulbis, J.M., Zhou, M., Mann, S., MacKinnon, R. (2000). *"Structure of the cytoplasmic beta subunit-T1 assembly of voltage-dependent K+ channels".* Science. **289:** 123-7.

Gullo, F., Ales, E., Rosati, B., Lecchi, M., Masi, A., Guasti, L., Cano-Abad, N.F., Arcangeli, A., López, M.G., Wanke, E. (2003). *"ERG K^+ channel blockade enhances firing and epinephrine secretion in rat chromaffin cells: the missing link to LQT2-related sudden death?".* FASEB J. **17:** 330-32.

Gustiananda, M., Liggins, J.R., Cummins, P.L., Gready, J.E. (2004). *"Conformation of prion protein repeat peptides probed by FRET measurements and molecular dynamics simulations".* Biophys. J. **86:** 2467-83.

Gustina, A.S., Trudeau, M.C. (2009). *"A recombinant N-terminal domain fully restores deactivation gating in N-truncated and long QT síndrome mutant hERG potassium channels".* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **106:** 13082-13087.

Gustina, A.S., Trudeau, M.C. (2011). *"hERG potassium channel gating is mediated by N- and C-terminal región interactions".* J. Gen. Physiol. **137:** 315-325.

Gustina, A.S., Trudeau, M.C. (2012). *"HERG potassium channel regulation by the N-terminal eag domain".* Cell Signal. **24:** 1592-8.

Haitin, Y., Carlson, A.E., Zagotta, W.N. (2013). *"The structural mechanism of KCNH-channel regulation by the eag domain".* Nature. **501:** 444-8.

Hegle, A.P., Marble, D.D., Wilson, G.F. (2006). *"A voltaje-driven switch for ion-independent signaling by ether-à-go-go K^+ channels".* PNAS **103:** 2886-2891.

Heim, R., Prasher, D.C., Tsien, R.Y. (1994). *"Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein".* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **91:** 12501-4.

Heinemann, S., Retting, J., Scott, V., Parcej, D.N., Lorra, C., Dolly, J., Pongs, O. (1994). *"The inactivation behaviour of voltaje-gated K-channels may be determined by association of alpha- and beta- subunits".* J. Physiol. Paris. **88:** 173-80.

Hellwig, N., Albrecht, N., Harteneck, C., Schultz, G., Schaefer, M. (2005). *"Homo- and heteromeric assembly of TRPV channel subunits".* J. Cell. Sig. **118:** 917-28.

Herzberg, B.M., Trudeau, M.C., Robertson, G.A. (1998). *"Transfer of rapid inactivation and sensivity to the class III antiarrhytmic drug E-4031 from HERG to M-eag channels".* J. Physiol. **511:** 3-14.

Heyduk, T. (2002). *"Measuring protein conformational changes by FRET/LRET".* Curr. Op. Biotechnol. **13:** 292-296.

Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K., Pease, L.R. (1989). *"Site-directed mutagenesis by overlap extensión using the polymerase chain reaction".* Gene. **77:** 51-59.

Holmgren, M., Jurman, M.E., Yellen, G. (1996). *"N-type inactivation and the S4-S5 region of the Shaker potassium channel".* J. Gen. Physiol. **108:** 195-206.

Hoshi, T., Zaggotta, W.N., Aldrich, R.W. (1990). *"Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation".* Science. **250:** 533-38.

Hoshi, T., Zaggotta, W.N., Aldrich, R.W. (1991). *"Two types of inactivation in Shaker K^+ channels; effects of alteration in the carboxy-terminal región".* Neuron. **7:** 547-56.

Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H. (1990). *"High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids".* Gene. **96:** 23-8.

Isacoff, L.A., Jan, Y.N., Jan, L.Y. (1991). *"Putative receptor for the cytoplasmic inactivation gate in the Shaker K^+ channels".* Nature. **353:** 86-90.

Jurkiewicz, N.Z., Sanguinetti, M.C. (1993). *"Rate-dependent prolongation of cardiac action potentials by a methensulfonanilide class III antiarrhythmic agent. Specific block of rapidly activating delayed rectifier K^+ current by dofetilide".* Circ. Res. **72:** 75-83.

Kaczmarek, L.K. (2006). *"Non-conducting functions of voltaje-gated ion channels".* Nat. Rev. Neurosci. **7:** 761-771.

Kenworthy, A.K. (2001). *"Imaging protein-protein interactions using fluorescence resonance energy transfer microscopy".* Methods. **24(3):** 289-96.

Kirber, M.T., Chen, K., Keaney Jr, J.F. (2007). *"YFP photoconversion revisited: confirmation of the CFP-like species".* Nat. Meth. **4:** 767-768.

Kobertz, W.R., Williams, C., Miller, C. (2000). *"Hanging gondola structure of the T1 domain in a voltage-gated K(+) channel".* Biochemistry. **39:** 10347-52.

Kobrinsky, E., Kepplinger, K.J.F., Yu, A., Harry, J.B., Kahr, H., Romanin, C., Abernethy, D.R., Soldatov, N.M. (2004). *"Voltage-gated rearrangements associated with differential β-subunit modulation of the L-type calcium channel inactivation".* Biophys. J. **87:** 844-57.

Kobrinsky. E., Stevens, L., Kazmi, Y., Wray, D., Soldatov, N.M. (2006). *"Molecular rearrangements of the Kv2.1 potassium channel termini associated with voltaje gating".* J. Biol. Chem. **281:** 19233-40.

Kobrinsky, E., Abrahimi, P., Duong, S.Q., Thomas, S., Harry, J.B., Patel, C., Lao, Q.Z., Soldatov, N.M. (2009). *"Effect of Ca(v) beta subunits on structural organization of Ca(v) 1.2 calcium channels".* Plos One **18:** e5587.

Kolbe, K., Schönherr. R., Gessner, G., Sahoo, N., Hoshi, T., Heinemann, S.H. (2010). *"Cysteine 723 in the C-linker segment confers oxidative inhibition of hERG1 potassium channels".* J. Physiol. **588:** 2999-3009.

Lakowicz, J.R. (2006). *"Principles of Fluorescence Spectroscopy".* 3rd ed. New York Springer Science.

Lastraioli, E., Guasti, L., Crociani, O., Simone, P., Hofmann, G., Witchel, H., Bencini, L., Calistri, M., Messerini, L., Scatizzi, M., Moretti, R., Wanke, E., Olivotto, M., Mugnai, G., Arcangeli, A. (2004). *"herg1 Gene and HERG1 protein are overexpressed in colorectal cancers and regulate cell invasión of tumour cells".* Cancer Res. **64:** 606-611.

Lecchi, M., Redaelli, E., Rosati, B., Gurrola, G., Florio, T., Crociani, O., Curia, G., Cassulini, R.R., Masi, A., Arcangeli, A., Olivotto, M., Schettini, G., Posan, L.D., Wanke, E. (2002). *"Isolation of a long-lasting eag-related gene-type K^+ current in MMQ lactotrophs and its accommodating role during slow firing and prolactin release".* J. Neurosci. **22:** 3414-3425.

Li, Q., Gayen, S., Chen, A.S., Huang, Q., Raida, M., Kang, C. (2010) *"NMR solution structure of the N-terminal domain of hERG and its interaction with the S4-S5 linker".* Biochem. Biophys. Res. Commun. **403:** 126-132.

López-Barneo, J., Hoshi, T., Heinemann, S.H., Aldrich, R.W. (1993). *"Effects of external cations and mutations in the pore región on C-type inactivation of Shaker potassium channels".* Receptor Channels. **1:** 61-71.

Mannuzzu, L.M., Moronne, M. M., Isacoff, E.Y. (1996), *"Direct physical measure of conformational rearrangement undelying potassium channel gating".* Science. **271:** 213-216.

Marshall, J., Molloy, R., Moss, G.W., Howe, J.R., Hughes. T.E. (1995). *"The jellyfish green fluorescent protein: a new tool for studying ion channel expression and function".* Neuron. **14:** 211-5.

McDonald T. V., Yu, Z., Ming, Z., Palma, E., Meyers, M.B., Wang, K.W., Goldstein, S.A., Fishman, G.I. (1997). *"A minK-HERG complex regulates the cardiac potassium current I (Kr)".* Nature. **388:** 289-92.

Miranda, P., Manso, D.G., Barros, F., Carretero, L., Hughes, T.E., Alonso-Ron, C., Domínguez, P., de la Peña, P. (2008). *"FRET with multiply labelled HERG K^+ channels as a reporter of the in vivo coarse architecture of the cytoplasmic domains".* Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell. Res. **1783:** 1681-1699.

Miyawaki, A., Tsien, R.Y. (2000). *"Monitoring protein conformations and interactions by fluorescence resonance energy transfer between mutants of green fluorescent protein".* Methods. Enzymol. **327:** 472-500.

Miyawaki. A., Sawano, A., Kogure, T. (2003). *"Light up cells: lablelling proteins with fluorophores".* Nat. Cell. Biol. Suppl: S1-7.

Morais-Cabral, J.H., Lee, A., Cohen, S.L., Chait, B.T., Li, M., Mackinnon, R. (1998). *"Crystal structure and functional analysis of the HERG potassium cannel N terminus: a eukaryotic PAS domain".* Cell. **95:** 649-55.

Moss, A.J., Kass, R.S. (2005) *"Long QT síndrome: from channel to cardiac arrhytmias".* J. Clin. Invest. **115:** 2018-2024.

Muskett, F.W., Thouta, S., Thomson, S.J., Bowen, A., Stansfeld, P.J., Mitcheson, J.S. (2011). *"Mechanistic insight into hERG K^+ cannel deactivation gating from the solution structure of the eag domain".* J. Biol. Chem. **286:** 6184-6191.

Ng, C.A., Hunter, M.J., Perry, M.D., Mobli, M., Ke, Y., Kuchel, P.W., King, G.F., Stock, D., Vandenberg, J.I. (2011). *"The N-terminal tail of hERG contains an amphipatic α-helix that regulates cannel deactivation".* PloS ONE **6:** e16191.

Niedenthal, R.K., Riles, L., Johnston, M., Hegemann, J.H. (1996). *"Green fluorescent protein as a marker for gene expression and subcellular localization in budding yeast".* Yeast. **12(8):** 773-86.

Ormo, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L.A., Tsien, R.Y., Remington, S.J. (1996). *"Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein".* Science. **273:** 1392-5.

Overholt, J.L., Ficker, E., Yang, T., Shams, H., Bright, G.R., Prabhakar, N.R. (2000). *"HERG-like potassium current regulates the resting membrane potential in glomus cells of the rabbit carotic body".* J. Neurophysiol. **83:** 1150-7.

Papa, M., Boscia, F., Canitano, A., Castaldo, P., Sellitti, S., Annunziato, L., Taglialatela, M. (2003). *"Expression pattern of the ether-a-go-go-related (erg) K^+ channel-encoding genes ERG1, ERG2, and ERG3 in the adult rat central nervous system".* J. Comp. Neurol. **466:** 119-35.

Pardo, L.A. (2004). *"Voltage-gated potassium channels in cell proliferation".* Physiol. **19:** 285-92.

Pardo, L.A., Contreras-Jurado, C., Zientkowska, M., Alves, F., Stümer, W. (2005). *"Role of voltaje-gated potassium channels in cáncer".* J. Membrane Biol. **205:** 115-24.

Piper, D.R., Hinz, W.A., Tallurri, C.K., Sanguinetti, M.C., Tristani-Firouzi, M. (2005). *"Regional specificity of hERG channels activation and inactivation gating".* J. Biol. Chem. **280:** 7206-17.

Pollok, B.A., Heim, R. (1999). *"Using GFP in FRET-based applications".* Trends. Cell. Biol. **9:** 57-60.

Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G., Cormier, M.J. (1992). *"Primary structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein".* Gene. **111**: 229-33.

Raschi, E., Vasina, V., Poluzzi, E., De Ponti, F. (2008). *"The hERG K^+ channel: target and antitarget strategies in drug development".* Pharmacol. Res. **57:** 181-195.

Rasmusson, R.L., Morales, M.J., Wang, S., Liu, S., Campbell, D.L., Brahmajothi, M.V., Strauss, H.C. (1998). *"Inactivation of voltaje-gated cardiac K^+ channels".* Circ. Res. **82:** 739-750.

Retting, J., Heinemann, S.H., Wunder, F., Lorra, C., Parcej, D.N., Dolly, J.O., Pongs, O. (1994). *Inactivation properties of voltaje-gated K^+ channels altered by presence of beta-subunit".* Nature. **369:** 289-94.

Roden, D.M. (1998). *"Mechanisms and management of proarrhytmia".* Am. J. Cardiol. **82:** 491-571.

Roeper, J., Sewing, D., Zhang, Y., Sommer, T., Warnner, S.G., Pongs, O. (1998). *"NIP domain prevents N-type inactivation voltaje-gated potassium channels".* Nature. **391:** 390-3.

Rosati, B., Marchetti, P., Crociani, O., Lecchi, M., Lupi, R., Arcangeli, A., Olivotto, M., Wanke, E. (2000). *"Glucose- and arginine- induced insulin secretion by human pancreatic beta-cells: the role of HERG K^+ channels in firing and release".* FASEB J. **14:** 2601-10.

Saenen, J.B., Labro, A.J., Raes, A., Snyders, D.J. (2006). *"Modulation of HERG gating by a charge cluster in the N-terminal proximal domain".* Biophys. J. **91:** 4381-91.

Sanguinetti, M.C., Jiang, C., Curran, M.E., Keating, M.T. (1995). *"A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhytmia: HERG channel encondes the I_{Kr} potassium channel".* Cell. **81:** 299-307.

Sanguinetti, M.C., Curran, M.E., Zou, A., Shen, J., Spector, P.S., Atkinson, D.L., Keating, M.T. (1996). *"Coassembly of*

K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I (Ks) potassium cannel". Nature. **384:** 80-3.

Schäfer, R., Wulfsen, I., Behrens, S., Weinsberg, F., Bauer, C.K., Schwarz, J.R. (1999). *"The erg-like current in rat lactotrophs".* J. Physiol. **518:** 401-416.

Schonherr, R., Heinemann, S.H. (1996). *"Molecular determinants for activation and inactivation of HERG, a human inward rectifier potassium channel".* J. Physiol. **493(3):** 635-42.

Schram, G., Pourrier, M., Melnyk, P., Nattel, S. (2002). *"Differential distribution of cardiac ion channel expression as a basis for regional specialization in electrical function".* Circ. Res. **90(9):** 939-50.

Selvin, P.R. (1995). *"Fluorescence resonance energy transfer".* Methods. Enzymol. **246:** 300-34.

Sheridan, D.L., Berlot, C.H., Robert, A., Inglis, F.M., Jakobsdottir, K.B., Howe, J.R., Hughes, T.E. (2002). *"A new way to rapidly create functional, fluorescent fusión proteins: random insertion of GFP with an in vitro transposition reaction".* BMC Neurosci. **3:** 7.

Shi, W., Wymore, R.S., Wang, H., Pan, Z., Cohen, I., Mckinnon, D., Dixon, J.E. (1997) *"Identification of two nervous system-specific members of the potassium channels gene family"*. J. Neurosci. **17:** 9243-32.

Shinomura, O., Johnson, F.H., Saiga, Y. (1962). *"Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminiscent protein from the luminous hydromedusean, Aequores".* J. Cell. Comp. Physiol. **59:** 223-39.

Smith, P.L., Baukrowitz, T., Yellen, G. (1996). *"The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel".* Nature. **379:** 833-836.

Smith, P.L., Yellen, G. (2002). *"Fast and slow voltaje sensor movements in HERG potassium channels".* J. Gen. Physiol. **119:** 275-293.

Spector, P.S., Curran, M.E., Keating, M.T., Sanguinetti, M.C. (1996a). *"Class III antiarrhytmic drugs block HERG a human cardiac delayed rectifier K^+ channel".* Circ. Res. **78:** 499-503.

Spector, P.S., Curran, M.E., Zou, A., Keating, M.T., Sanguinetti, M.C. (1996b). *"Fast inactivation causes rectification of the IKr channel".* J.Gen. Physiol. **107(5):** 611-9.

Stryer, L. (1978). *"Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler".* Annu. Rev. Biochem. **47:** 819-46.

Stryer, L., Haugland, R.P. (1967). *"Energy transfer: a spectroscopic ruler".* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **58:** 719-726.

Subbiah, R.N., Clarke, C.E., Smith, D.J., Zhao, J., Campbell, T.J., Vandenberg, J.I. (2004). *"Molecular basis of slow activation of the human ether-à-go-go related gene potassium channel".* J. Physiol. **558:** 417-31.

Subbiah, R.N., Kondo, M., Campbell, T.J., Vandenberg, J.I. (2005). *"Tryptophan scanning mutagenesis of the HERG K^+ channel: The S4 domain is loosely packed and likely to be lipid exposed".* J. Physiol. **569:** 367-79.

Subramaniam, V., Hanley, Q.S., Clayton, A.H., Jovin, T.M. (2003). *"Photophysics of green and red fluorescent proteins: implications for quantitative microscopy".* Methods. Enzymol. **360:** 178-201.

Takanishi, C.L., Bykova, E.A., Cheng, W., Zheng, J. (2006). *"GFP-based FRET analysisi in live cells".* Brain. Res. **1091:** 132-9.

Thaler, C., Vogel, S.S., Ikeda, S.R., Chen, H. (2006). *"Photobleaching of YFP does not produce a CFP-like species that affects FRET measurements".* Nat. Methods. **3:** 491-93.

Titus. S.A., Warmke, J.W., Ganetzky, B. (1997). *"The Drosophila erg K1 channel polipeptide is encoded by the seizure locus".* J. Neurosci. **17:** 875-81.

Tristani-Firouzi, M., Chem, J., Mitcheson, J.S., Sanguinetti, M.C. (2001). *"Molecular biology of K^+ channels and their role in cardiac arrhytmias".* Am. J. Med. **110:** 50-9.

Trudeau, M.C., Warmke, J.W., Ganetzky, B., Robertson, G.A. (1995). *"HERG; a human inward rectifier in the voltaje-gated potassium cannel family".* Science. **269:** 92-95.

Uversky, V.V., Dunker, A.K. (2010). *"Understanding protein non-folding".* Biochim. Biophys. Acta. **1804:** 1231-64.

Vandenberg, J.I., Walker, B.D., Campbell, T.J. (2001). *"HERG K^+ channels: friend and foe".* Trends Pharmacol. Sci. **22:** 240-246.

Van Munster, E.B., Kremers, G.J., Adjobo-Hermans, M.J.W., Gadella Jr, T.W.J. (2005). *"Fluorescence resonance energy transfer (FRET) measurement by gradual acceptor photobleaching".* J. Microsc. **218:** 253-62.

Van Slyke, A.C., Rezazadeh, S., Snopkowski, M., Shi, P., Allard, C.R., Claydon, T.W. (2010). *"Mutations within the S4-S5 linker alter voltaje sensor constraints in hERG K^+ channels".* Biophys. J. **99:** 2841-2852.

Verrier, S.E., Soling, H.D. (2006). *"Photobleaching of YFP does not produce a CFP-like species that affects FRET measurements".* Nat. Meth. **3:** 491-2.

Viloria, C.G., Barros, F., Giráldez, T., Gómez-Varela, D., de la Peña, P. (2000). *"Differential effects of amino-terminal distal and proximal domains in the regulation of human erg K(+) cannel gating".* Biophys. J. **79:** 231-46.

Wang, S. y Hazelrigg, T. (1994). *"Implications for bcd mRNA localization from spatial distribution of exu protein in Drosophila oogenesis".* Nature. **369:** 400-03.

Wang, S., Liu, S., Morales, M.J., Strauss, H.C., Rasmusson, R.L. (1997a). *"A quantitative analysis of the activation and inactivation kinetics of HERG expressed in Xenopus oocytes".* J. Physiol. **502:** 45-60.

Wang, X.J., Reynolds, E.R., Deak, P., May, L.M. (1997b). *"The seizure locus encodes the Drosophila homolog of the HERG potassium cannel".* J. Neurosci. **17:** 882-890.

Wang, J., Trudeau, M.C., Zappia, A.M., Robertosn, G.A. (1998). *"Regulation of deactivation by an amino terminal domain in Human ether-a-go-go-related gene potassium channels".* J. Gen. Physiol. **112:** 637-647.

Wang, J., Myers, C.D., Robertson, G.A. (2000). *"Dynamic control of deactivation gating by a soluble amino-terminal domain in HERG K^+ channels".* Biophys. J. **115:** 749-758.

Warmke, J.W. y Ganetzky, B. (1994). *"A family of potassium cannel genes related to eag in Drosophila and mammals"*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **91:** 3438-42.

Weerapura, M., Nattel, S., Chartier, D., Caballero, R., Hebert, T. (2002). *"A comparision of currents carried by HERG, with and without coexpression of MiRP1, and the native rapid delayed rectifier current. Is MiRP1 the missing link?".* J. Physiol. **540:** 15-27.

Wissmann, R., Bildl, W., Oliver, D., Beyermann, M., Kalbitzer, H.R., Bentrop, D., Fakler, B. (2003). *"Solution structure and function of the "tandem inactivation domain" of the neuronal A-type potassium channel Kv1.4".* J. Biol. Chem. **278:** 16142-50.

Witchel, H.J., Hancox, J.C. (2000). *"Familial and acquiered long QT síndrome and the cardiac rapid delayed rectifier potassium current"*. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. **27:** 753-766.

Wymore, R.S., Gintant, G.A., Wymore, R.T., Dixon, J.E., Mckinnon, D., Cohen, I.R. (1997). *"Tissue and species distribution of mRNA for the IKr-like K^+ channel, erg".* Cir. Res. **80:** 261-268.

Yamada, A., Gaja, N., Ohya, S., Muraki, K., Narita, H., Ohwada, T., Imaizumi, I. (2001). *"Usefulness and limitation of DiBAC4(3), a voltaje-sensitive fluorescent dye, for the measurement of membrane potentials regulated by recombinant large conductance Ca^{2+}-activated K^+ channels in HEK293 cells".* Jpn. J. Pharmacol. **86:** 342-350.

Yuste, R. (2005). *"Fluorescence microscopy today"*. Nat. Methods **2:** 902-4.

Zaggotta, W.N., Hoshi, T., Aldrich, R.W. (1990). *"Restoration of inactivation in mutants of Shaker potassium channels by a peptide derived from ShB".* Science. **250:** 568-71.

Zagotta, W.N., Olivier, N.B., Black, K.D., Young, E.C., Olson, R., Gouaux, E. (2003). *"Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels".* Nature. **425:** 200-205.

Zal, T., Gascoigne, N.R. (2004). *"Photobleaching-corrected FRET efficiency imaging of live cells".* Biophys. J. **86:** 3923-39.

Zehelein, J., Zhang, W., Koenen, M., Graf, M., Heinemann, S.H., Katus, H.A. (2001). *"Molecular cloning and expression of c-erg, the ether a go-go related gene from canine myocardium".* Plfügers Arch. **442:** 188-191.

Zhang, Y., Wang, H., Wang, J., Han, H., Nattel, S., Wang, Z. (2003). *"Normal function of HERG K^+ channels expressed in HEK293 cells requieres basal protein kinase B activity".* FEBS Lett. **534:** 125-132.

Zheng, J. (2013). *"Domain-domain interactions in ion channels".* J. Gen. Physiol. **142:** 347-50.

Zhou, W., Cayabyab, F.S., Pennefather, P.S., Swchlichter, L.C., DeCoursey, T.E. (1998). *"HERG-like K^+ channels in microglia".* J. Gen. Physiol. **111:** 781-794.

Zhu, Y., Golden, C.M., Ye, J., Wang, X.Y., Akbarali, H.L., Huizinga, J.D. (2003). *"ERG K^+ current regulates pacemaker activity in ICC".* Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. **285:** G1249-G1258.

Zou, A., Xu, Q.P., Sanguinetti, M.C. (1998). *"A mutation in the pore región of HERG K^+ channels expressed in Xenopus oocytes reduces rectification by shifting the voltaje dependence of inactivation".* J. Physiol. **509:** 129-137.

PUBLICACIONES

OPEN ACCESS Freely available online

PLoS one

Molecular Determinants of Interactions between the N-Terminal Domain and the Transmembrane Core That Modulate hERG K^+ Channel Gating

Jorge Fernández-Trillo[◔], **Francisco Barros***[◔], **Angeles Machín, Luis Carretero, Pedro Domínguez, Pilar de la Peña***

Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Oviedo, Oviedo, Spain

Abstract

A conserved *eag* domain in the cytoplasmic amino terminus of the human *ether-a-go-go*-related gene (hERG) potassium channel is critical for its slow deactivation gating. Introduction of gene fragments encoding the *eag* domain are able to restore normal deactivation properties of channels from which most of the amino terminus has been deleted, and also those lacking exclusively the *eag* domain or carrying a single point mutation in the initial residues of the N-terminus. Deactivation slowing in the presence of the recombinant domain is not observed with channels carrying a specific Y542C point mutation in the S4–S5 linker. On the other hand, mutations in some initial positions of the recombinant fragment also impair its ability to restore normal deactivation. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) analysis of fluorophore-tagged proteins under total internal reflection fluorescence (TIRF) conditions revealed a substantial level of FRET between the introduced N-terminal *eag* fragments and the *eag* domain-deleted channels expressed at the membrane, but not between the recombinant *eag* domain and full-length channels with an intact amino terminus. The FRET signals were also minimized when the recombinant *eag* fragments carried single point mutations in the initial portion of their amino end, and when Y542C mutated channels were used. These data suggest that the restoration of normal deactivation gating by the N-terminal recombinant *eag* fragment is an intrinsic effect of this domain directed by the interaction of its N-terminal segment with the gating machinery, likely at the level of the S4–S5 linker.

Citation: Fernández-Trillo J, Barros F, Machín A, Carretero L, Domínguez P, et al. (2011) Molecular Determinants of Interactions between the N-Terminal Domain and the Transmembrane Core That Modulate hERG K^+ Channel Gating. PLoS ONE 6(9): e24674. doi:10.1371/journal.pone.0024674

Editor: Bernard Attali, Sackler Medical School, Tel Aviv University, Israel

Received June 21, 2011; **Accepted** August 15, 2011; **Published** September 15, 2011

Copyright: © 2011 Fernández-Trillo et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) by grant BFU2009-11262 and a Consolider-Ingenio project (SICI; CSD2008-00005). J.F.-T. and L.C. hold predoctoral fellowships from Ministerio de Educación y Ciencia (MEC) and Fundación para el Fomento en Asturias de la Investigación Científica Aplicada y la Tecnología (FICYT) of Spain. A.M. holds a postdoctoral contract from SICI-Consolider 2008. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: fbarros@uniovi.es (FB); pdelapena@uniovi.es (PdlP)

◔ These authors contributed equally to this work

Introduction

Potassium channels encoded by the human *ether-a-go-go*-related gene (hERG) mediate the cardiac repolarizing current I_{Kr} [1,2]. Mutations in the hERG gene and drug inhibition of hERG channels underlie inherited and acquired type 2 long QT syndrome [1,3–8], a ventricular repolarization disorder that predisposes affected individuals to ventricular arrhythmia and sudden death [3,9,10]. Mammalian ERG channels also play an important role in setting the electrical behavior of various cell types, including pituitary lactotrophs, hippocampal astrocytes, glomus carotic body cells, pancreatic β-cells, smooth muscle myocytes, neurones and several tumour cells (reviewed in [11–15]).

The crucial determinant of the physiological roles of hERG is its ability to operate as an inward rectifier, even though the channel has the typical molecular topology of depolarization-activated channels [16]. Thus, due to the slow activation superposed on a fast inactivation upon depolarization, a voltage-dependent reduction in whole cell conductance and a bell-shaped I–V relationship is observed at positive voltages. During repolarization, hERG currents increase due to fast recovery from inactivation followed by a much slower deactivation. This maintains the channels open during longer periods of time at negative voltages, giving rise to the typical hERG tail currents [15]. In the case of the heart, this contributes to the repolarization of the cardiac action potential and to the prevention of arrhythmias induced by early after-depolarizations or ectopic beats [17,18].

The molecular basis for the slow deactivation that contributes to the critical hERG tail currents is not totally understood. Previous work has indicated that an N-terminal domain conserved in the eag channel family comprising residues 1–135 of hERG (the *eag* domain), determines its slow deactivation, since channels with deletions of most of the amino terminus or of just the eag domain, with short deletions in the N-terminal most segment of the amino terminus, or with point mutations in the *eag* domain, all show rapid deactivation kinetics [19–26]. Since short deletions at the beginning of the N-terminus mimic the effect of more extensive amino terminal removal, it has been proposed that the initial subdomain segment of the *eag* domain (residues 1–26) acts as an essential regulator of hERG deactivation gating [22,23,26]. The

crystal structure of the *eag* domain revealed the presence of a Per-Arnt-Sim (PAS) folding for residues 26–135, but it provided no structural information about the initial 1–26 N-terminal segment [21]. Recent NMR data identified two structurally differentiated regions in the N-terminal tail of hERG, an initial flexible and unstructured stretch extending up to residues 10–13, and an amphipathic α-helix constituted of amino acids 13–23 [26–28]. Subsequently, both the initial flexible segment and the alpha helical structure have been proposed to participate in conferring slow deactivation kinetics to the channel, but different interpretations about their contribution to this effect have been made. Thus, a critical role of the N-terminal α-helix and the PAS stabilizing the open state by an interaction with the C-terminal C-linker and cNBD domains [27] or with the S4–S5 linker in the central channel core [28], has been proposed. Alternatively, it has also been suggested that, rather than being involved in specific interactions with other domains, the amphipathic helix could act mainly as a spacer between the initial portion of the N-terminus and the PAS bound to some place in the central channel core, to adequately position the initial unstructured segment for interaction with the gating machinery at the level either of the S4–S5 linker or of the C-linker and cNBD domains [26].

We have recently demonstrated the physical proximity between the initial segment of the hERG N-terminus and the S4–S5 linker, since a disulfide bond can be formed between these intracellular domains carrying engineered cysteines, covalently locking the channels in a non-conductive state [29]. Such close proximity might allow for a physical interaction between these cytoplasmic domains. On the other hand, it has also been shown that the expression in *Xenopus* oocytes of a recombinant hERG N-terminal *eag* domain fragment tagged with a fluorescent protein, is able to restore normal deactivation gating properties of channels lacking almost the whole amino terminus [30,31]. We have tried to gain some additional insights into the molecular requirements for this functional restoration to take place in transfected mammalian cells. In particular, we have checked the impact of structural alterations smaller than the truncation of the whole amino terminus in the channel molecule, since in addition to the well recognized influence of the initial *eag* domain structures on deactivation, both activation and deactivation gating can also be affected by the amino-terminal proximal domain under certain conditions [24,25]. Therefore, the effect of the recombinant N1-135/YFP fragment was systematically tested against the Δ2-135 channel background that only lacks the portion of the protein corresponding to the exogenously added segment. We also checked the influence of single point mutations in the putatively interacting partners (i.e. the recombinant N-terminal domain, the N-terminal most segment of the channel N-terminus, and the S4–S5 linker), on re-establishment of normal slow deactivation. Our data suggest that the restoration of normal deactivation gating by the recombinant *eag* fragment is an intrinsic effect of this domain driven by the interaction of its initial segment with the gating machinery, likely at the level of the amino terminal portion of the S4–S5 linker.

Materials and Methods

Molecular Biology

The hERG, hERG Δ2-135 and hERG Δ2-370 clones have been previously described [24,25]. To generate the single point mutants V3C, Y542C and G546C, site-directed mutagenesis was performed using the PCR-based overlap method with custom-made primers as described previously [24,25,29,32–34]. For mammalian cell expression, the different hERG constructs and mutants were cloned into pcDNA3. Generation of the N- and C-terminally labeled WT hERG channels, TRH receptors labeled with CFP, and the hERG channel double labeled with both CFP and YFP, has been detailed elsewhere [35]. For C-terminal labeling of the hERG mutants, HindIII/BstEII or BstEII/BglII fragments from the different variants were used to replace the corresponding fragment in the full-length fluorescent hERG channel.

To generate the C-terminally labeled *eag* domain construct a HindIII/BamHI cDNA fragment containing the coding region corresponding to hERG residues 1–135 was cloned in-frame in pEYFP-N1 (Clontech). For this purpose a forward primer containing a HindIII site and the coding sequence corresponding to hERG amino acids 1–10 was used in PCR reactions with a reverse primer containing the coding sequence for residues 125–135 and the recognition site for BamHI. An analogous strategy was used to obtain the different variants with point mutations in the N-terminal segment of the labeled 1–135 YFP *eag* domain (V3C, R4C, G6C, V8C) by introducing the appropriate mutation in the forward primer used for amplification. All constructs were verified by standard fluorescence-based DNA sequencing to confirm the mutations and verify the absence of errors.

The membrane-localized CFP-YFP tandem construct (Rho-PYC) was kindly provided by Dr. Teresa Giráldez (University of La Laguna, Canary Islands, Spain). It contains the prenylation site of Rho added to the C-terminal domain of a YFP-CFP fusion [36], to anchor the fluorescent protein tandem to the lipids via the Rho-lipid binding motif.

Tissue culture and transfections

Human embryonic kidney (HEK293) and Chinese hamster ovary (CHO) cells were grown at 37°C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO_2 and plated in 35 mm diameter tissue culture plastic dishes containing poly-L-lysine coated coverslips for electrophysiological measurements as previously described [35]. For TIRF and TIRF/FRET imaging, cells were seeded on 35 mm poly-D-lysine coated FluoroDish tissue culture dishes with cover glass bottom (WPI Inc, Sarasota, FL, USA). Cells were transiently transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) with 2–3 μg of plasmid DNA as previously described [35]. When co-transfecting constructs, plasmids were added in the indicated ratios, to maintain a proper molar ratio of expressed donor and acceptor fluorophores. When non-labeled channels were used for recordings, the plasmid DNA containing the channel construct was mixed with pEGFP-N3 encoding enhanced green fluorescent protein (eGFP) as a marker for transfection in a 5:1 ratio. Recordings were typically performed 24–72 h after transfection.

Electrophysiology

Ionic current recordings were performed at room temperature in the whole-cell configuration of the patch-clamp technique as detailed elsewhere [35]. The standard extracellular saline contained (in mM): 137 NaCl, 4 KCl, 1.8 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 10 glucose, and 10 HEPES (pH 7.4 with NaOH). The pipette solution contained (in mM): 140 KCl, 2 $MgCl_2$, 0.7 $CaCl_2$, 1.1 EGTA, and 10 HEPES (pH 7.4 with KOH). Kinetics parameters of activation and deactivation were obtained as previously described [24,25,34,35,37,38]. Time constants of deactivation were determined from negative–amplitude biexponential fits to the decaying phase of the tail currents upon membrane repolarization at the indicated potentials, using a function $y = A_f \exp(-T/\tau_f) + A_s \exp(-T/\tau_s) + C$ in which T is time, τ_f and τ_s are the time constants of fast and slow components, A_f and A_s are the relative amplitudes

of these components, and C is a constant. For simplicity, only the values of the deactivation time constants corresponding to the fast decaying current major component at negative voltages are shown on the figures.

TIRF microscopy and FRET measurements

Through-the-objective TIRF microscopy was achieved with a Zeiss Axiovert 100 microscope equipped with a vibration isolation system (Newport, Irvine, CA, USA) to minimize drift and noise, a Zeiss 100× oil-immersion TIRF objective (1.45 NA; Oil, Alpha Plan Fluar), and a laser light delivery system consisting of an Argon-Ion LGK7880ML laser outputting 488 and 514 nm lines and a 442 nm Toptica iBeam 45 mW solid state laser. The excitation light was selected with an acoustic optical tunable filter (TILL Poly-line AOTF-controlled multi laser-line combiner; Till-Photonics, Gräfelfing, Germany). The light from a Polychrome IV monochromator was also combined with the laser into a single condenser (Till-Photonics). The Zeiss filter cube contained a polychroic mirror with reflection bands at 442 and 514 nm and band-passes at 475/30 and 560/60 nm (z442/514/633 rpc; Chroma Technology, Bockinham, VT, USA), and two z442/514× and z440/514 m excitation and emission filters (Chroma), respectively. CFP and YFP emissions were simultaneously collected using a DUAL-View Micro-Imager (Optical Insights, Santa Fe, NM, USA) equipped with a filter cube containing a HQ535/30 emission filter to isolate YFP emission, and a 505dcxr dichroic mirror for separation of CFP and YFP emission wavelengths. Images were collected and processed with an Imago 12-bit CCD camera (Till-Photonics). The camera, laser system and monochromator were controlled by TILLvisION 4.0 software, that was also used for image recording and processing. The TIRF angle was adjusted by eye to give the signature TIRF illumination to the experimental chamber.

FRET efficiency was measured by donor (CFP) de-quenching following photobleaching of the acceptor (YFP) fluorophore [35]. Due to the reduced depth of field of the 100×1.45 NA objective and to the critical dependence of the TIRF images on the focal plane, it was important to adjust the focus before every image acquisition. Whereas this was not relevant for the photobleachable YFP, it led to some unavoidable direct photobleaching of CFP that compromised the rigorous quantification of CFP fluorescence (F_{CFP}) increases in a continuous way during the relatively long YFP photobleaching period. This also precluded the possibility of performing linear regression of F_{CFP} recovery versus F_{YFP} decrease to extrapolate the F_{CFP} values to zero F_{YFP} [35]. As an alternative, the objective was attached to a piezo focusing device controlled by the TILLvisION software, and used to acquire a z stack series of CFP fluorescence images both before and after YFP bleach. Election of the best in focus focused image of the series was subsequently performed either by eye or using the AutoFocus function of the software. Carefully adjusting the laser power to the necessary F_{CFP} output in each experiment, caused little CFP photobleaching (<2%). To attain a near maximal level of YFP bleach to accurately know the magnitude of the F_{CFP} increase, we used a combination of 514 nm laser and monochromator also tuned to 514 nm to permanently illuminate the YFP during the photobleaching period. As previously reported [36], this increased the bleaching level by ≈20%, up to around ≈95% of total YFP bleaching in 60–90 s. Individual cells in which the bleach level did not reach at least 90% were discarded from the analysis. Cells showing dim fluorescence leading to very low signal-to-noise ratios and those in which the F_{YFP}/F_{CFP} ratio did not reach a ratio that ensured a proper YFP/CFP molar stoichiometry were also discarded [35]. Quantitative FRET levels were calculated by drawing regions of interest around the entire area of the cell and subtracting the background in a cell-free region for each image. Alternatively, the pre- and post-bleach cell masks were aligned using the TILLvisION software to compensate for any drift during the bleaching process, and images were compared pixel by pixel using NIH Image J [36]. Analogous results were obtained with and without this analysis variant. FRET was expressed as FRET efficiency (E_{FRET} in %), defined as described previously by the expressions $E_{FRET} = E_{FRET(APP)}\ \alpha_D \times 100 = [1-(F_{DA}/F_D)]\ \alpha_D \times 100$ in which F_{DA} and F_D are the fluorescence intensities of the donor before and after photobleaching of the acceptor, respectively, and α_D would indicate the fraction of total donor forming donor-acceptor complexes, a factor approaching 1 under our experimental conditions [35].

Statistics

All values are presented as the mean ± S.E. Statistical significance was tested with the parametric unpaired two-tailed Student's t-test. When significant differences in standard deviation were present an alternate Welch's test or non-parametric Wilcoxon or Mann-Whitney test were also used. The results obtained were considered significant at $p<0.05$.

Results

Restoration of slow WT-type deactivation kinetics of N-terminus structurally altered hERG channels by a recombinant eag domain

Truncation of almost the whole amino terminus of the hERG K^+ channel induces a marked acceleration of deactivation kinetics [19–25]. To explore the structural determinants of this behavior, we used HEK-293 and CHO mammalian cells in which a recombinant hERG N-terminal *eag* domain fragment genetically fused to the fluorescent protein eYFP (N1-135/YFP) was coexpressed with N-terminus truncated channels (hERG Δ2-370), and also channels in which only the region corresponding to the *eag* domain was deleted (hERG Δ2-135). In both cases, channel constructs were also fused at the carboxy terminus to eCFP, since it has been demonstrated that fluorescent proteins fused to the hERG C terminus do not appreciably modify their gating properties [30,35]. Apart from providing a suitable platform for subsequent spectroscopic analysis, the presence of the fluorescent label seemed to improve the functional expression level of some mutated channels (not shown), and did not influence the functional effects of the recombinant domains (see below). Consistent with previous results [30,31], when N1-135/YFP was coexpressed with hERG Δ2-370 (N1-135/YFP: hERG Δ2-370 DNA ratio 1:3), the deactivation kinetics were significantly ($p<0.02$ at all voltages) slowed to a rate similar to that of WT hERG (Fig. 1A,B). Almost identical results were obtained when the recombinant *eag* fragment was coexpressed with channels lacking only the protein segment corresponding to the *eag* domain (hERG Δ2-135, $p<0.01$), indicating that it is not necessary to remove the whole amino terminus, but only the segment used to restore the function (i.e. the *eag* domain), to achieve complete recovery of normal deactivation properties (Fig. 1C). Remarkably, the effect of the recombinant *eag* fragment was dose-dependent, since only a modest slowing of tail current decay was attained when the DNA ratio of N1-135/YFP to hERG Δ2-135 was lowered from 1:3 to 1:10 (Fig. 1C). On the other hand, further increases in the proportion of N1-135/YFP relative to hERG Δ2-135 channels (at DNA ratio 1:1) did not modify the results obtained with the 1:3 ratio (not shown). This saturation of the regulatory effect indicates that the deactivation slowing is not caused by a non specific binding of the recombinant domain to the channel molecule. It is important to

note that the slowing down of closing by the recombinant *eag* domain is not due to a variation of the driving force at a given voltage, because the *I–V* relationship of the hERG Δ2-135 channel remained the same in the presence of N1-135/YFP (Fig. S1 and Table S1). Similar results were obtained with the hERG Δ2-370 channel (Table S1). Therefore, no differences in total potential energy driving deactivation (i.e., $-(\Delta G_o\text{-}z_gEF)$, see [25,39,40]) were expected with or without the recombinant *eag* fragment. Note also that unlike the recovery in the closing rates observed with the recombinant *eag* domain, the rightward shifts in steady-state activation voltage dependence caused by the N-terminal deletions were not reversed with N1-135/YFP. This suggests that the effect of the recombinant *eag* fragment was selective for deactivation and that the shift in the equilibrium toward the closed state caused by the deletions was not corrected in the presence of the exogenously added *eag* domain.

It has been proposed that the initial segment of the *eag* domain constitutes an essential regulator of hERG deactivation [26–28]. We sought to use a single point mutant in the initial residues of the channel N-terminus, which had also shown fast rates of deactivation. Thus, we studied the behavior of a full-length channel construct carrying a Val to Cys mutation at residue 3 of the protein sequence (hERG V3C), both in the absence and the presence of the recombinant N1-135/YFP fragment. Surprisingly, the accelerated deactivation kinetics of the V3C channel mutant were significantly slowed by N1-135/YFP (Fig. 1D), despite the maintenance of a complete and structurally unaltered protein structure in the amino terminus (e.g. the amphipathic α-helix and the PAS domain). This demonstrates that the single point mutation is able to induce enough disengagement of the N-terminus from the closing machinery, allowing the recombinant fragment to bind and recover a substantial fraction of deactivation slowing.

We also checked if the presence of the fluorescent protein labels in both the channel and the recombinant fragment could influence the observed recovery of deactivation. However, almost the same result as that observed with the hERG V3C channel C-terminally labeled with CFP, was obtained with unlabeled hERG V3C (Fig. 1D). This indicates that the restoration of normal gating was due to a specific interaction of the recombinant *eag* fragment with the channel, and not to an unspecific effect directed by some residual oligomerization of the fluorescent labels.

Role of the hERG S4–S5 linker in restoration of slow deactivation kinetics by the recombinant eag domain

Apart from its role coupling the voltage sensor to the activation gate [41], the S4–S5 linker region has been repeatedly proposed as a crucial structure for the influence of the N-terminus in the hERG gating properties [20–26,28,30,40,42–46]. In fact, it is well known that mutations in this linker result in accelerated deactivation rates similar to those observed when the amino terminal domain is deleted [19–26,30,41,44,45]. However, direct proof of a physical interaction between the amino terminal domains and the linker has been lacking. We reasoned that if the recombinant *eag* domain regulates deactivation through a direct interaction with the gating machinery at the level of the S4–S5 linker, structural perturbations in this linker could impair the effect of the exogenously added fragment. Consistent with this hypothesis, introduction of a Tyr to Cys mutation at residue 542 of the S4–S5 linker (hERG Y542C) accelerated channel deactivation to a level similar to that observed with the amino terminal modified channels. Furthermore, the presence of the mutation abolished the recovery of the closing kinetics induced by the N1-135/YFP fragment (Fig. 2A,B). An obvious interpretation of these results could be that the recombinant fragment is not able to compete with the wild-type *eag* domain, which occludes its access to the interaction site in the channel core. The results shown in Fig. 2C demonstrate that this is not the case. Thus, the presence of the recombinant N1-135/YFP domain also failed to recover the slow gating of the *eag* domain deleted channel that also carries a Y542C mutation (hERG Δ2-135/Y542C construct). Almost identical results were obtained with the Δ2-135/Y542C channel labeled with CFP at the C-terminus (not shown). This indicates again that the recombinant fragment effect was not driven by any unspecific interaction between the fluorescent protein labels.

It has been shown previously that introduction of a Gly to Cys mutation at residue 546 of the S4–S5 linker does not accelerate hERG channel closing [25,46]. Also, a Cys at this position is not able to effectively establish a disulfide bond with a second cysteine located at the beginning of the hERG amino terminus [29]. To check the specificity of the Y542C effect, we generated a new channel construct (hERG Δ2-135/G546C) lacking the *eag* domain and with a G546C mutation in the S4–S5 linker. In contrast to the results observed with the Y542C mutation, in the presence of N1-135/YFP, the closing kinetics of the Δ2-135/G546C construct was slowed down to the level observed in wild-type hERG (Fig. 2D). These results further suggest that the structural modification of Tyr 542 at the beginning of the S4–S5 linker specifically impairs the noncovalent interaction of the soluble *eag* domain with the channel core, precluding the restoration of normal deactivation by the recombinant fragment.

Impairment of the recombinant *eag* domain effect by mutations in the initial residues of its amino end

Recent results from our laboratory indicated that a disulfide bond can be formed between the N-terminal most segment of the amino terminus and the initial segment of the S4–S5 linker in which pairs of engineered cysteines have been introduced, demonstrating a physical proximity between these regions which may allow for a physical interaction between these cytoplasmic domains [29]. This prompted us to check whether mutation of the residues located at the beginning of the N1-135/YFP N-terminus could phenocopy the effect of the Y542C mutation. The effect of the recombinant fragment restoring normal deactivation kinetics of the hERG Δ2-135 channel was partially reversed when the recombinant N1-135/YFP carried the V3C mutation at the beginning of the amino terminus (Fig. 3). However, when this construct was coexpressed with the recombinant *eag* domain mutated at residues 4 or 6 of the protein sequence (R4C and G6C *eag* domain mutants), the deactivation kinetics were the same as those observed with the hERG Δ2-135 channel alone. Finally, the ability of the recombinant fragment to restore slower closing was significantly improved when the hERG Δ2-135 channel was coexpressed with a recombinant N1-135/YFP domain with a V8C mutation, indicating a certain degree of specificity for the mutation-induced impairment of the *eag* domain restoration effects. Since these data were obtained with Δ2-135 channels and N1-135 fragments both carrying fluorescent labels, they further demonstrate that the presence of the labels does not act as a determinant for restoration of normal gating. Furthermore, they emphasize the relevance of an unaltered structure at the beginning of the *eag* domain sequence to allow its functionally productive interaction with the gating machinery.

Detection of channel protein and recombinant domain interactions by TIRF/FRET

As a direct test for the physical proximity between the recombinant fragments and the hERG channels showing restored

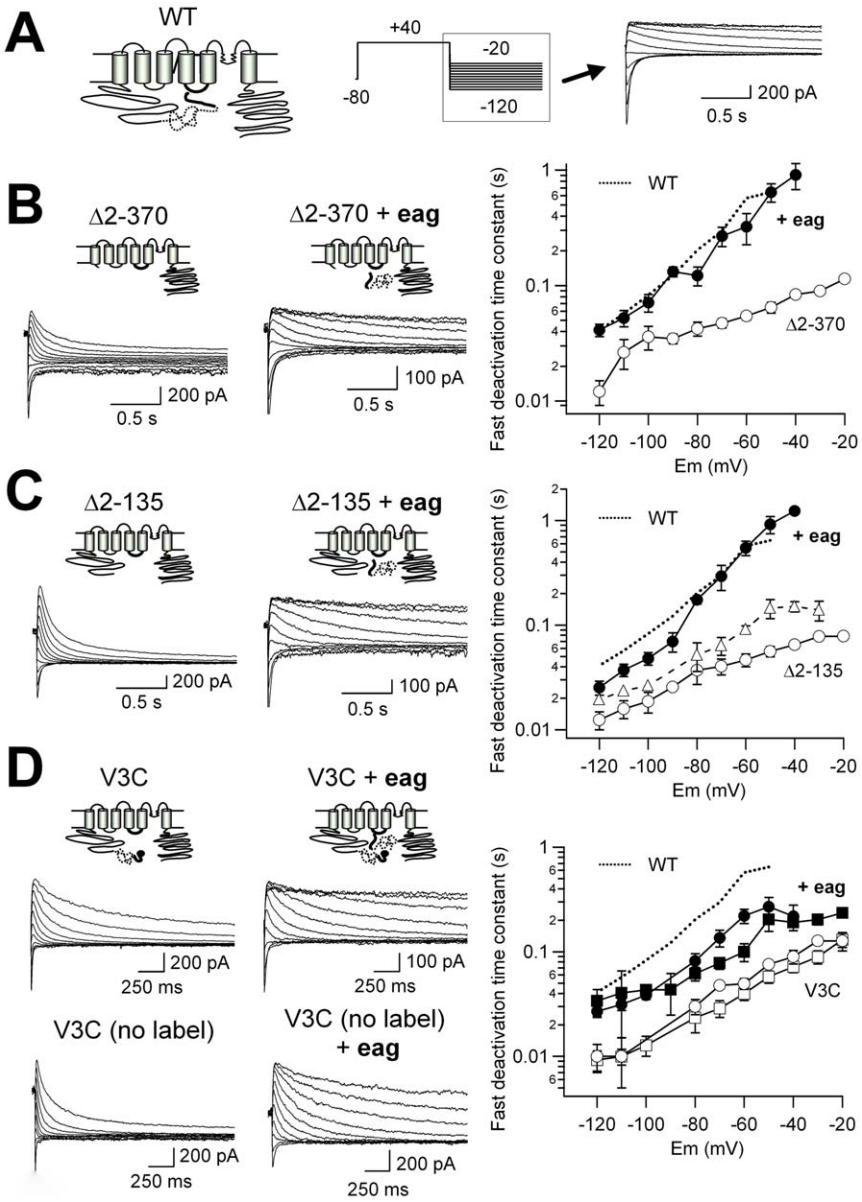


Figure 1. Recombinant *eag* domain-induced recovery of deactivation slowing in h-ERG channels carrying different structural alterations in the N-terminus. A. Schematic of the hERG. K^+ channel with N-terminal *eag* domain and S4–S5 linker indicated. The PAS region of the *eag* domain is represented as a dotted line. The S4–S5 linker and the initial segment of the amino terminus corresponding to residues 1–26 are illustrated as thick solid lines. The pulse protocol used to study the deactivation kinetics and a family of representative tail currents obtained from WT channels at the times marked by the *dashed box*, are shown on the *right*. Note the initial increase in current due to recovery from inactivation and the subsequent decay from which deactivation rates are measured at every repolarization voltage. Note also the reversion of the current flow at around −90 mV. **B–D**. Effect of the N1-135/YFP recombinant fragment on deactivation kinetics of hERG channels truncated in the N-terminus (Δ2-370; panel B), lacking only the *eag* domain (Δ2-135; panel C) or carrying a single point V3C mutation (black sphere) at the beginning of the amino terminus (V3C, panel D). Channel schematics and families of representative tail currents elicited using the pulse protocols illustrated in panel A, are shown on the *left*. For clarity, the fluorescent labels located at the C-terminus of the channel constructs and the recombinant fragments are not represented in the schemes. Plots of fast deactivation time constants at different repolarization voltages derived from bi-exponential fits to the decaying phase of the tail currents (see Methods) are shown on the *right*. Data from WT hERG channels are also shown as *dotted lines* for comparison. Open and closed symbols correspond to data obtained in the absence or the presence of the recombinant fragment, respectively. DNAs for the channel and the N1-135/YFP fragment were maintained at a 3:1 ratio during the transfection. The triangles in *C* illustrate deactivation rates from Δ2-135 channels co-expressed with the recombinant fragment using a DNA ratio of 10:1. Circles and squares in the *right* panel of D represent the results of experiments using V3C channels with and without a C-terminal fluorescent label, respectively. $n \geq 6$ cells for each.
doi:10.1371/journal.pone.0024674.g001

gating, we measured the Förster fluorescence resonance energy transfer (FRET) levels between both putatively interacting partners. For this purpose donor de-quenching following photobleaching of the acceptor fluorophore was used (see Methods), in order to accurately quantify the FRET efficiencies [35]. Measurements were performed under total internal reflection microscopy (TIRF) to selectively measure FRET in the proximity of the plasma membrane, since only fluorescent proteins at a

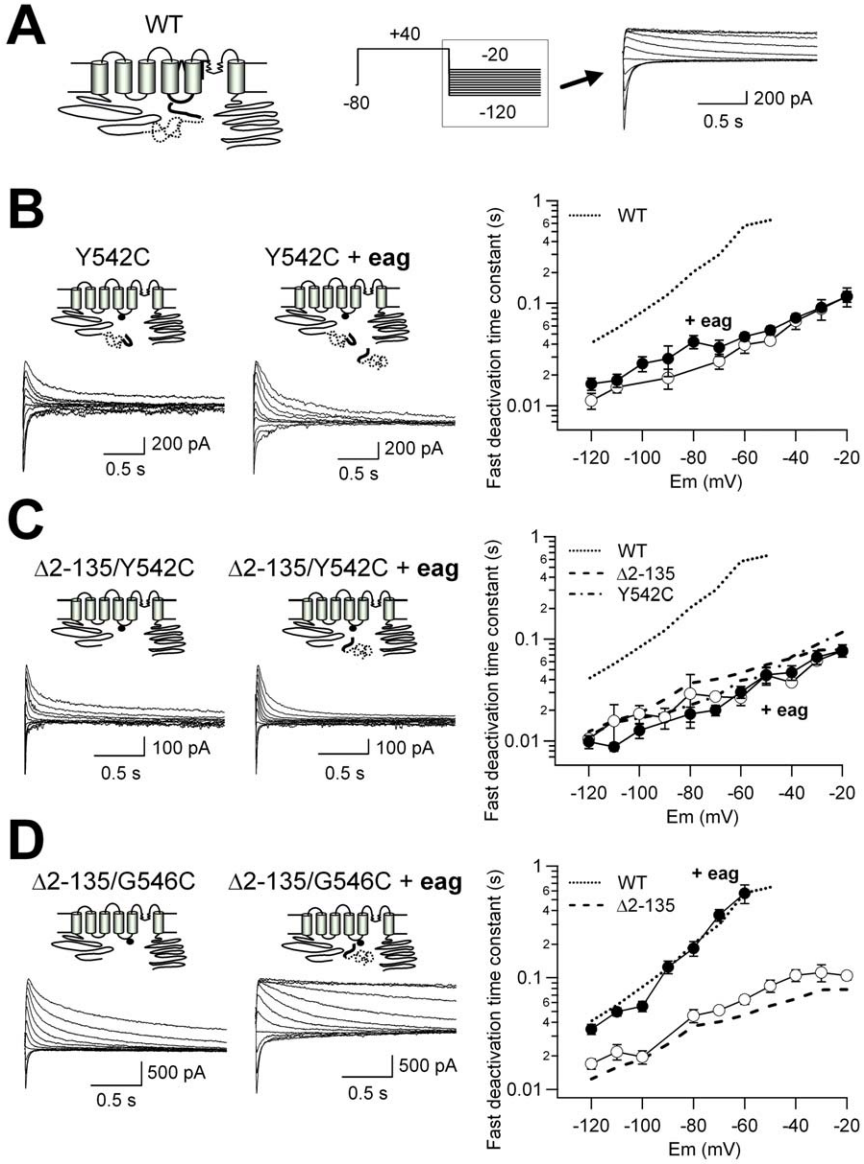


Figure 2. The recombinant N1-135/YFP fragment does not restore slow deactivation of hERG channels carrying a Y542C mutation in the S4–S5 linker. A. Schematic of the WT hERG K^+ channel and representative tail currents obtained with the indicated protocol are shown for comparison. **B**. Lack of effect of the N1-135/YFP recombinant fragment on deactivation kinetics of Y542C channels. Channel schematics and families of representative tail currents are shown on the left. Black dots indicate the approximate position of the Y542C mutation. Plots of fast deactivation time constants at different repolarization voltages are shown on the *right*. Open and closed symbols correspond to data obtained in the absence or the presence of the recombinant fragment, respectively. Data from WT hERG channels are also shown as a *dotted line* for comparison. $n = 10$ and 6 for Y52C and Y542C+eag, respectively. **C**. The N1-135/YFP recombinant fragment does not slow down deactivation kinetics of Δ2-135 channels carrying a Y542C mutation in the S4–S5 linker. Open and closed symbols correspond to data obtained with the Δ2-135 plus Y542C construct in the absence and the presence of the recombinant fragment, respectively. Data from WT, Δ2-135 and Y542C hERG channels are also shown as *dotted* and *dashed lines* for comparison. $n = 6$ and 5 for Δ2-135/Y52C and Δ2-135/Y542C+eag, respectively. **D**. The presence of the N1-135/YFP recombinant fragment fully restores slow deactivation gating of Δ2-135 channels carrying the G546C mutation in the S4–S5 linker. Open and closed symbols correspond to data obtained with the Δ2-135 plus G546C construct in the absence or the presence of the recombinant fragment, respectively. Data from WT and Δ2-135 hERG channels are also shown as *dotted* and *dashed lines* for comparison. $n = 6$ and 8 for Δ2-135/G546C and Δ2-135/Y546C+eag, respectively.
doi:10.1371/journal.pone.0024674.g002

distance of ≈100 nm above the glass coverslip where the cells are attached are studied, thus avoiding most of the contamination from cytoplasmic signals [47]. In our case this could be particularly important because, unlike other typical membrane proteins, only a reduced fraction of the total fluorescence corresponding to properly assembled and fully functional hERG complexes is detected in the perimeter (i.e. the plasma membrane) of the hERG-labeled expressing cells [35]. Furthermore, the TIRF conditions would also tend to minimize the nonspecific signal due to the presence in the cells of the soluble *eag* domain labeled with the acceptor YFP.

The advantages of using TIRF microscopy to optically isolate the fluorescently labeled proteins in the proximity of the plasma membrane, allowing for signal selection from the molecules located there, are illustrated in Fig. S2. Subsequently, we employed the CFP and YFP pairs of labeled channels and

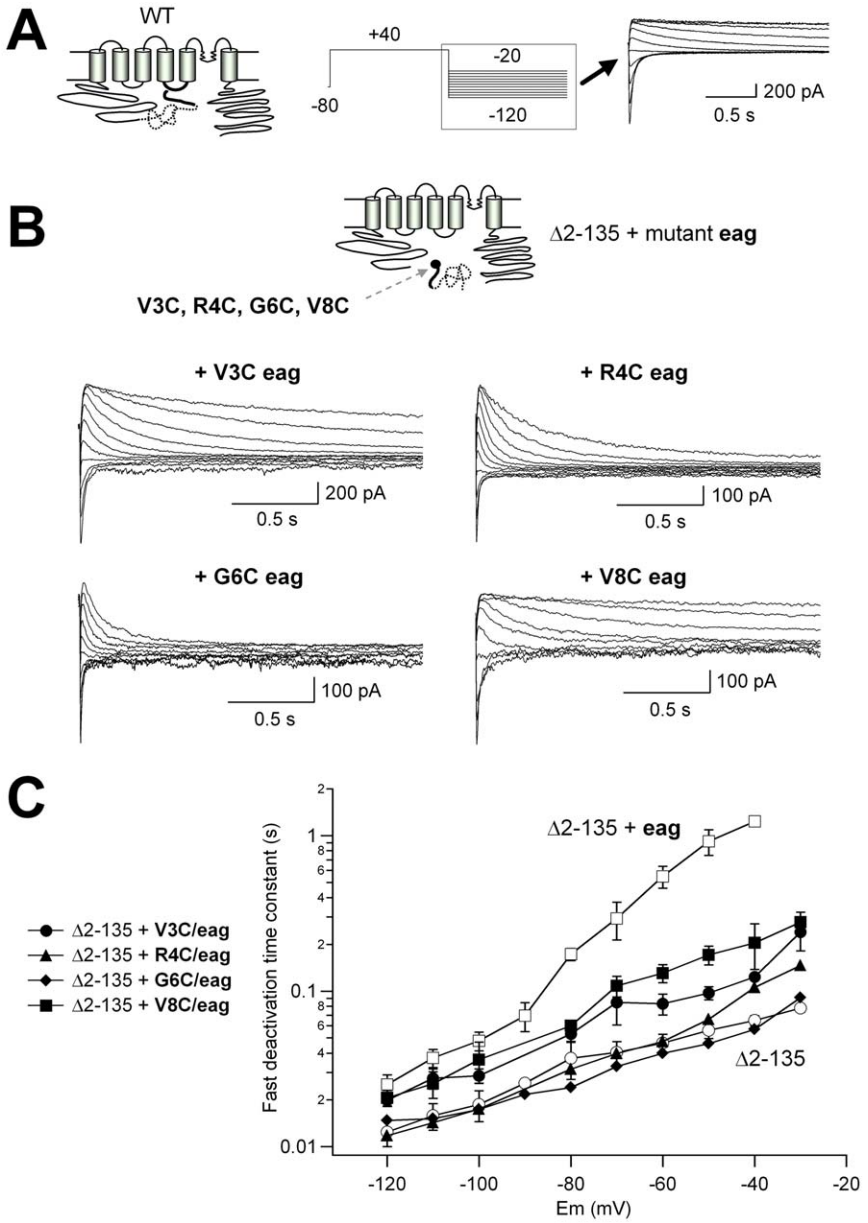


Figure 3. Mutations in the initial segment of the recombinant N1-135/YFP fragment affect its ability to recover deactivation slowing in hERG Δ2-135 channels. A. Schematic of the WT hERG K^+ channel and representative tail currents obtained with the indicated protocol are shown for comparison. **B**. Schematic of the Δ2-135 channel and the recombinant fragment with the approximate positioning of the single point mutations (*black dot*). For clarity, the fluorescent labels located at the C-terminus of the channel constructs and the recombinant fragments are not represented in the schemes. **C**. Representative tail currents from CFP-labeled Δ2-135 channels co-expressed with the N1-135/YFP recombinant fragments carrying the indicated mutations. Horizontal scale bars correspond to 0.5 s. **D**. Plots of fast deactivation time constants at different repolarization voltages. Data from Δ2-135 channels with and without the recombinant fragment as in Figure 1 (*open symbols*) are also shown for comparison.
doi:10.1371/journal.pone.0024674.g003

recombinant fragments to test for their physical proximity and/or interaction at the plasma membrane using FRET spectroscopy under TIRF conditions. As a positive control, we first used a fully functional hERG construct double-labeled at the amino and carboxy terminal ends (hERG 1YFP/1158CFP), known to yield a substantial level of FRET with epifluorescence imaging [35]. In this case, photobleaching of YFP by more than 90% resulted in a significant increase in CFP fluorescence (Figs. 4A,C), yielding an E_{FRET} value of $13.47 \pm 1.04\%$ ($n = 35$), similar to that obtained with the same construct under wide-field epi-fluorescence ($11.64 \pm 0.62\%$, $n = 23$; $p = 0.17$, Student's t test). The level of FRET was even higher ($23.3 \pm 2.26\%$, $n = 15$) when we used a plasma membrane-targeted fusion construct of CFP and YFP (Rho-pYC) in which a near maximal proximity between both fluorophores is expected (Fig. 4C). By contrast, the averaged FRET efficiency became almost zero when two presumably non-interacting CFP/YFP-tagged proteins were used, namely the hERG channel and the TRH receptor labeled at their carboxy ends (Figs. 4B,C; see also [35]). In all cases, we ensured that no correlation exists between the FRET efficiency of every individual

cell and the expression level of the labeled proteins (not shown). These data indicate that the FRET signals are not due to aggregates formed by overexpressed proteins or to random encounters between diffusing fluorophores. Therefore, we used the FRET/TIRF combination as a reporter of proteins in the plasma membrane, to test for the physical proximity between the recombinant *eag* domain and the channel.

In cells coexpressing *eag* hERG domains fused to YFP and hERG Δ2-135 carrying CFP at the C-terminus, the level of E_{FRET} amounted to 13.25±1.05% (n = 12; Fig. 5A). Interestingly, this value was almost the same as that measured with the hERG double labeled at the amino and carboxy ends (see above). This demonstrates that the *eag* domain locates in close proximity to the core of hERG Δ2-135 channels at the membrane. It also suggests that such close proximity may allow for a physical interaction between them related to the functional restoration of normal deactivation by the recombinant *eag* fragment. By contrast, a negligible E_{FRET} was observed between N1-135/YFP and wild-type hERG labeled with CFP at the C-terminus (0.49±2.99%, n = 12). In this case the covalently attached endogenous *eag* domain is probably occluding access of the exogenous domain to its interaction site in the channel core. Finally, a slightly weaker but substantial E_{FRET} (9.61±3.8%, n = 13; $p = 0.36$ *vs* Δ2-135) was observed in cells coexpressing N1-135/YFP and hERG V3C mutant channels C-terminally labeled with CFP.

Effect of mutations in the S4–S5 linker and the amino end of the *eag* domain on TIRF/FRET levels

We next asked whether the FRET efficiency could be modified by introducing structural perturbations in the putative interacting partners. We observed no FRET when the Δ2-135 channel carried a Y542C mutation at the beginning of the S4–S5 linker (hERG Δ2-135/Y542C, Fig. 5A). By contrast, a FRET signal (12.5±2.1%, n = 11; $p = 0.66$ *vs* Δ2-135) equivalent to that observed with the Δ2-135 channel, was obtained when a cysteine substituted the endogenous glycine in position 546 of this linker (hERG Δ2-135/G546C). As discussed below, these data would be consistent with the low potency of the recombinant fragment to restore the slow deactivation of the Y542C mutant, and also with the full recovery of the slow deactivation kinetics of the Δ2-135/G546C construct. Very reduced E_{FRET} levels were also observed when the recombinant N1-135/YFP fragment carried single point mutations in residues 3, 6 or 8 (V3C, G6C and V8C mutants; Fig. 5B). Thus, the FRET levels were minimized not only in the presence of a mutation that fully knocked out the ability of the recombinant *eag* to restore deactivation kinetics of the hERG Δ2-135 channels (Fig. 3), but also with the V3C and V8C mutated N1-135/YFP fragments, which were able to partially restore hERG Δ2-135 deactivation gating. It seems unlikely that a simple amino acid change in the otherwise unordered initial segment of the *eag* domain [26–28], causes a gross perturbation in the general structure of this domain. Therefore, the reduction of FRET in these experiments rather suggests that the mutations could cause a subtle alteration in the relative orientation and/or distance between the fluorophores, due to a weakened interaction of the mutated *eag* domain with the channel. Further work and perhaps use of smaller size and/or differently located fluorophores would be necessary to provide an adequate interpretation of these results.

Discussion

In this study, we present data indicating that subtle structural variations either in the N-terminal most segment of the *eag* domain, or in the initial portion of the S4–S5 linker, strongly influence the ability of a recombinant *eag* domain fragment to restore normal deactivation gating of hERG channels showing accelerated closing kinetics. Using *Xenopus* oocytes, it has been shown that injection of a peptide corresponding to the entire *eag* domain, direct application of a peptide corresponding to the first 16 amino acids of this domain to excised membrane macro-patches, or expression of a recombinant N1-135 *eag* domain, can slow deactivation gating of N-terminally truncated hERG channels [21,23,30]. Our results using transfected mammalian cells demonstrate that to achieve complete recovery of normal deactivation properties by the recombinant *eag* domain it is not necessary to delete the whole amino terminus, but only the segment corresponding to this domain. Interestingly, our data also indicate that the exogenously added *eag* domain is able to revert a substantial fraction of the acceleration of closing induced by a single point V3C mutation at the beginning of the hERG amino terminus. The reason for which the recombinant fragment only partially restores slow deactivation of the V3C mutant, even though the mutation is sufficient to cause a similar disabling of the amino terminal-dependent slowing of deactivation as with the more extensive truncations of the N-terminus, remains to be established. It is probable that although the single point mutation is able to cause enough disengagement of the N-terminus from the closing machinery to induce a strong acceleration of closing, some remaining endogenous channel structures may partially antagonize the interaction between the relatively large N1-135/YFP fragment and the V3C channel. This could also be consistent with the fact that the FRET/TIRF signal detected between the recombinant *eag* fragment and the full length hERG V3C/1158CFP channel is slightly smaller than that observed between hERG Δ2-135 and the *eag* domain, which fully restores the slow channel deactivation.

Noticeably, the FRET was negligible between the N1-135/YFP fragment and the Δ2-135 channel carrying the Y542C mutation in the S4–S5 linker, whose deactivation is not slowed down when the recombinant *eag* domain is supplied. In contrast, a maximal level of FRET was obtained with the G546C mutant, in which the slow deactivation rate is fully restored by the exogenous domain. Note, however, that a precise correlation between the quantitative level of FRET between proteins labeled with the quite voluminous GFP-based fluorophores and the extent of the kinetic restoration may be difficult to establish, since the molecular proximity measured by FRET and the specific molecular interaction on which the functional effect relies, may not necessarily coincide [35,48]. Therefore, although strongly indicative of interactions between the two proteins to which these fluorophores are linked, little indication is provided by the FRET measurements about the short range distances determining the deactivation slowing.

The fact that the *eag* domain-dependent recovery effect is impaired by point mutations both in the initial portions of the N1-135 *eag* domain and in the S4–S5 linker suggests that an interaction takes place between these regions in the full-length channels in order to regulate deactivation gating. This would also be consistent with our recent data showing that a disulfide bond can be formed between the N-terminal most segment of the amino terminus and the initial segment of the S4–S5 linker after placing a pair of engineered cysteines at residues Val3 and Tyr542, respectively [29]. However, whereas the oxidation-dependent modification is preferentially exerted on closed channels locking them in a non-conducting state, the putative interactions proposed here must take place in the open state leading to a slowing of closing. The interaction between the initial segment of the amino terminus and the S4–S5 linker in the closed state of the V3C+Y542C double mutant is fully compatible with the observed modulation of

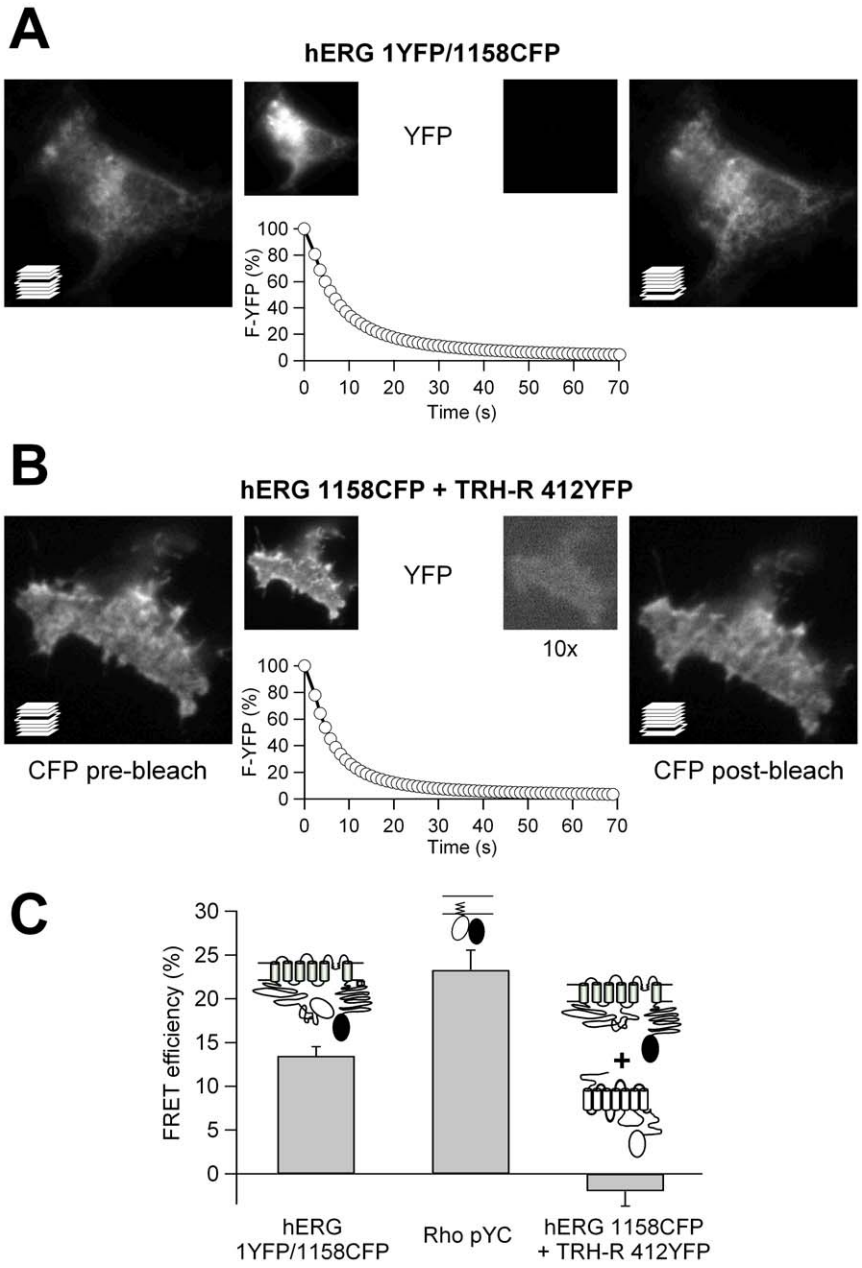


Figure 4. Detection of FRET between hERG N- and C-terminally-located CFP and YFP tags under TIRF conditions, but not between two non-interacting proteins. A. Fluorescence micrographs under TIRF illumination of a single cell expressing a hERG construct double-labeled with YFP and CFP in the amino and carboxy terminal ends, respectively. CFP images were obtained before (*left*) and after (*right*) selective photobleaching of YFP as illustrated in the middle panels. CFP and YFP images were adjusted so that the same pixel range was used before and after photobleaching. Note that maximal pixel intensities are not the same for CFP and YFP. Note also the substantial increase in CFP emission after the effective YFP photobleaching, indicative of FRET. A cartoon illustrating the performance of a *z* stack to optimally focus the micrographs corresponding to the CFP emission channel (see Methods) is shown superimposed to the CFP images. **B**. Absence of CFP emission increases in cells co-expressing hERG channels labeled with CFP at the carboxy terminus and TRH receptors C-terminally labeled with YFP. **C**. Positive and negative controls for quantification of E_{FRET} under TIRF microscopy. FRET efficiency was quantified as the fractional increase in CFP emission following photobleaching of YFP as described in Methods. Schematics of the constructs are shown on top of the bars. Data from a hERG construct double-labeled with YFP and CFP at the amino and carboxy terminal ends (hERG 1YFP/1158CFP), a membrane targeted tandem construct of CFP and YFP (Rho-PYC), and co-expressed C-terminally labeled hERG and TRH receptors (hERG 1158CFP+TRH-R 412YFP), are shown. Data from 35, 22 and 15 cells, respectively, were averaged for the graph. White and black ovals represent YFP and CFP, respectively.
doi:10.1371/journal.pone.0024674.g004

activation properties by the N-terminal-most region of the channel N-terminus and with the reported ability of the Y542C mutation to positively shift the steady-state activation $V_{0.5}$ and its less negative ΔG_o, therefore shifting the equilibrium toward the closed state [25]. Nevertheless, covalently locking the channels in the non-conductive state using disulfide bond formation precludes further analysis of additional interactions and may limit other subsequent dynamic rearrangements of the gating machinery. Thus, it is possible that

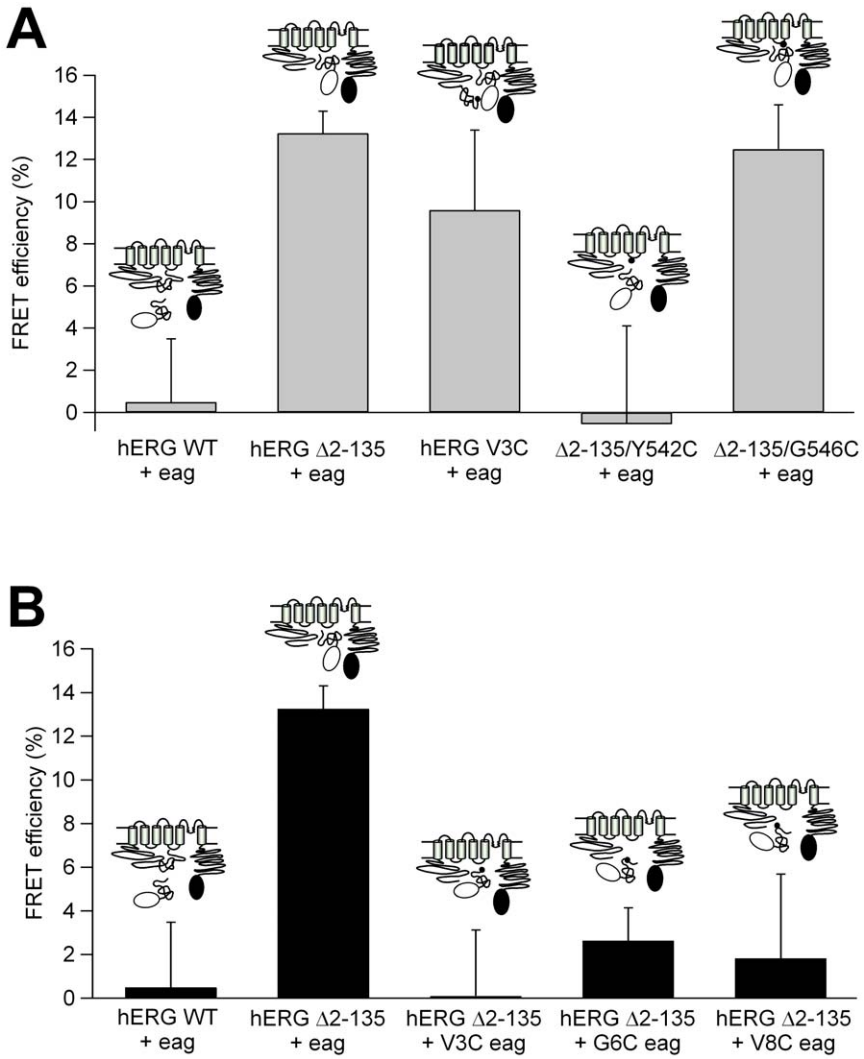


Figure 5. Comparison of FRET/TIRF levels using different hERG constructs and recombinant N1-135 *eag* domain fragments. A. Effect of single point mutations in the amino end and the S4–S5 linker of hERG on E_{FRET} levels between recombinant N1-135/YFP *eag* domains and Δ2-135 hERG channels C-terminally labeled with CFP. Averaged data from 7–13 cells are shown. Note the analogous E_{FRET} values obtained with constructs Δ2-135 and 1YFP/1158CFP in panel C of Figure 4, and with hERG Δ2-135/G546C and RhoPYC also in Figure 4C. **B**. Effect of single point mutations in the initial residues of the N1-135/YFP *eag* domain on E_{FRET} levels. Averaged data from 8–13 cells are shown on the graph. Data from WT and Δ2-135 channels co-expressed with recombinant *eag* domains without mutations as in panel A, are also shown for comparison.
doi:10.1371/journal.pone.0024674.g005

although subtle differences may exist between the two conformational (and functional) states of the protein, a physical proximity between the amino end and the S4–S5 linker can be maintained in both the closed and the open states. In this context, rather than being considered a static and permanent situation, the *eag*/S4–S5 interaction documented here might be considered as part of a more extensive network of cytoplasmic interactions [29] also involving the PAS and cNBD domains, dynamically modulated during the different phases of the gating process.

The results presented here suggest that the N-terminal most unstructured and flexible segment of the hERG *eag* domain [26–28], plays a major role in deactivation slowing through specific interactions with other domains of the channel. This would be consistent with the concept that conformational flexibility and disorder can help some protein domains to engage in fast yet selective interactions crucial for specific functions [49,50]. Indeed, intrinsic flexibility of the S4–S5 linker, one of the partners of the N-terminus/core interacting pair proposed here, has recently been recognized as an essential modulatory factor of hERG gating [46]. Poor structuralization and flexibility of the N-terminal most segment of the amino terminus has been recognized in *Shaker*-like channels as an important factor for allowing this protein segment to snake its way to reaching its interaction site near the channel and produce N-type inactivation [51–53]. If this characteristic is similarly involved in docking the initial segment of the hERG amino end with its interaction site in the channel core (e.g. to the S4–S5 linker) remains an interesting possibility.

It should be noted that our results do not rule out the existence of other sites of interaction between the cytoplasmic domains themselves and between them and the transmembranal core, contributing to modulation of activation and deactivation gating. These could include the intra- and/or inter-subunit interaction of the PAS domain and the amphipathic 13–23 α-helix ahead of it with the C-terminal cNBD [26,27,31] and perhaps with some regions of the S4–S5 linker, to adequately position the flexible N-terminal tail region towards the gating machinery [26]. Remarkably, the N-terminal subdomains of

the *eag* domain, the PAS domain and the cNBD all appear to be required but none sufficient to maintain slow deactivation kinetics [26,27,31]. However, the fact that in the absence of any other structural alteration a subtle change in the N-terminal most segment of the amino terminus (e.g the V3C mutation or the short Δ2–9 deletion [26]) can maximally affect deactivation, points to a direct primary role for this region in the modulation of channel gating.

An interesting observation noted here was that the recovery of normal deactivation kinetics of hERG Δ2-135 channels by the recombinant N1-135 *eag* domain, was not accompanied by a similar reversion of the positive shift in activation voltage dependence caused by the deletion. This suggests that the influence of the amino terminus on activation is exerted by a different mechanism that remains impaired in the presence of the recombinant fragment. Obvious candidates to participate in this phenomenon are the N-terminus proximal domain, the S4–S5 linker and the C-terminus C-linker/CNBD. In the first possibility, alterations in the electrostatic influence exerted by an amino acid cluster near the S1 transmembranal segment on the gating machinery at the level of the S4–S5 linker [24,40] could be involved. Interestingly, it has been suggested that this influence may depend on the proper orientation of the first 16 N-terminal residues of the *eag* domain toward the S4–S5 linker in the channel core [25]. Note, however, that some hormonal effects on activation gating that require an intact amino terminus, are exerted in the absence of this cluster [34]. Finally, a significant impact of the CNBD on hERG activation, perhaps independent of any interaction with the PAS domain and apart from its influence on deactivation gating, has also recently been described [31].

In summary, based in our work and that of others [26–31] we propose an unifying model, in which the PAS domain and the amphipathic α-helix ahead of it act as a scaffold and a spacer helping to correctly orientate the initial unstructured and flexible tail of the amino end towards the amino terminal portion of the S4–S5 linker to modulate hERG gating (this report and [26,29]). As described for the C-terminal C-linker/cNBD regions in HCN2 [54], these regions of hERG could hang centrally below the transmembrane core, establishing at their top and side surfaces extensive contacts with the more peripheral *eag* domains [35]. This would help to place the PAS domain and the amphipatic α-helix in position allowing them to also influence channel gating, via the S4–S5 linker and/or allosterically through their interaction with those C-terminal structures [27,31] that are directly linked to the channel gate at the bottom of helix S6. Altogether, this would strengthen our recent proposal that physical interactions between some cytoplasmic hERG domains constitute an essential component of the gating machinery [29]. Further work will be necessary to confirm the overall validity of our model and, in particular, to unravel the details about its conformational rearrangements and dynamic variations during the functionality of the channel.

Supporting Information

Figure S1 Recombinant N1-135 *eag* domain fragment coexpression has no effect on activation voltage dependence rightward shifts caused by the Δ2-135 deletion. Pulse protocol and voltage-clamp recordings of a family of currents from h-ERG Δ2-135 channels in the absence or the presence of coexpressed N1-135/YFP recombinant *eag* domain fragments, are shown at the *top*. Normalized I/V relationships for the indicated constructs are shown at the *bottom*. Fractional activation curves were obtained from tail current data at −50 mV after 1 or 5 s depolarizations between −80 and +80 mV in 20 mV increments from a holding potential of −80 mV. The continuous lines correspond to Boltzmann curves $h(V) = I_{max}\ [1/(1+\exp((V-V_{0.5})/k))]$, which best fitted the data. Plots corresponding to wild-type hERG with and without CFP label in the carboxy end (ref. 35) are also shown for comparison.
(TIF)

Figure S2 Selective excitation of fluorophores at plasma membrane and submembrane regions near the coverslip-cell interface under TIRF illumination. A. Comparison of cell fluorescence images under wide-field epi-fluorescence (*left*) and TIRF illumination (*right*) after focusing the objective at the level of the glass coverslip-water interface. Note the notorious reduction of the background and out-of-focus fluorescence under TIRF conditions, associated with a remarkable increase in the sharpness and contrast of the layer corresponding to the cell footprint in contact with the glass, mainly representing the plasma membrane environment. Fluorescence micrographs correspond to a HEK-293 cell expressing YFP-labeled TRH receptors known to preferentially distribute in the plasma membrane (ref. 35). **B**. TIRF-induced preferential photobleaching of labeled proteins in and near the plasma membrane abutting the coverglass. Note the very similar fluorescence levels observed in the cells imaged with epifluorescence microscopy and focused near the cell center, both before and after nearly complete selective photobleaching with TIRF illumination of the layer in contact with the glass surface. This indicates that TIRF-based photobleaching preferentially targets fluorescence emissions from YFP-labeled TRH-R molecules at/near the plasma membrane compared with other cellular pools of the same molecules.
(TIF)

Table S1 Comparison of activation parameters for all constructs in the presence and the absence of the recombinant fragment.
(DOC)

Acknowledgments

We thank Teresa González for technical assistance, Dr. Kevin Dalton for proofreading the text and Dr. Teresa Giráldez for providing the Rho-PYC construct. We also thank Dr. Ángel Martínez-Nistal, head of the Scientific and Technical Services of the University of Oviedo, the loan of the epifluorescence light source for our patch-clamp setup.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FB PdlP. Performed the experiments: JF-T FB PdlP. Analyzed the data: JF-T FB PdlP. Contributed reagents/materials/analysis tools: JF-T FB AM LC PD PdlP. Wrote the paper: FB PdlP.

References

1. Sanguinetti MC, Jiang C, Curran ME, Keating MT (1995) A mechanistic link between an inherited and an adquired cardiac arrhythmia. Cell 81: 299–307.
2. Trudeau MC, Warmke JW, Ganetzky B, Robertson GA (1995) HERG, a human inward rectifier in the voltage-gated potassium channel family. Science 269: 92–95.
3. Viskin S (1999) Long QT syndromes and torsade de pointes. Lancet 354: 1625–1633.
4. Chiang C, Roden DM (2000) The long QT syndromes: Genetic basis and clinical implications. J Am Coll Cardiol 36: 1–12.
5. Keating MT, Sanguinetti MC (2001) Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias. Cell 104: 569–580.
6. Redfern WS, Carlsson L, Davis AS, Lynch WG, MacKenzie I, et al. (2002) Relationship between preclinical cardiac electrophysiology, clinical QT interval prolongation and torsade de pointes for a broad range of drugs: evidence for a provisional safety margin in drug development. Cardiovasc Res 58: 32–45.

7. Thomas D, Zhang W, Wu K, Wimmer A-B, Gut B, et al. (2003) Regulation of potassium channel activation by protein kinase C independent of direct phosphorylation of the channel protein. Cardiovasc Res 59: 14–26.
8. Finlayson K, Witchel HJ, McCulloch J, Sharkey J (2004) Adquired QT interval prolongation and HERG: Implications for drug discovery and development. Eur J Pharmacol 500: 129–142.
9. Roden DM, Lazzara R, Rosen M, Schwartz PJ, Towbin J, Vincent GM (1996) Multiple mechanisms in the long-QT syndrome. Current knowledge, gaps, and future directions. Circulation 94: 1996–2012.
10. Schwartz PJ (2005) Management of the long QT syndrome. Nat Clin Pract Cardiovasc Med 2: 346–351.
11. Sanguinetti MC, Tristani-Firouzi M (2006) hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. Nature 440: 463–469.
12. Wanke E, Restano-Cassulini R (2006) Toxins interacting with *ether-a-go-go*-related gene voltage-dependent potassium channels. Toxicon 49: 239–248.
13. Raschi E, Vasina V, E. Poluzzi E, De Ponti F (2008) The hERG K^+ channel: target and antitarget strategies in drug development. Pharmacol Res 57: 181–195.
14. Arcangeli A, Crociani O, Lastraioli E, Masi A, Pilozzi S, Becchetti A (2009) Targeting ion channels in cancer: A novel frontier in antineoplastic therapy. Curr Med Chem 16: 66–93.
15. Sanguinetti MC (2010) HERG1 channelopathies. Pflügers Arch 460: 265–276.
16. Warmke JW, Ganetzky B (1994) A family of potassium channel genes related to *eag* in *Drosophila* and mammals. Proc Natl Acad Sci USA 91: 3438–3442.
17. Smith PL, Baukrowitz T, Yellen G (1996) The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel. Nature 379: 833–836.
18. Lu Y, Mahaut-Smith MP, Varghese A, Huang CL, Kemp PR, Vandenberg JI (2001) Effects of premature stimulation on HERG K^+ channels. J Physiol 537: 843–851.
19. Schönherr R, Heinemann SH (1996) Molecular determinants for activation and inactivation of HERG, a human inward rectifier potassium channel. J Physiol 493: 635–642.
20. Spector PS, Curran ME, Zou A, Keating MT, Sanguinetti MC (1996) Fast inactivation causes rectification of the I_{Kr} channel. J Gen Physiol 107: 611–619.
21. Morais-Cabral JH, Lee A, Cohen SL, Chait BT, Li M, MacKinnon R (1998) Crystal structure and functional analysis of the HERG potassium channel N terminus: a eukaryotic PAS domain. Cell 95: 649–655.
22. Wang J, Trudeau MC, Zappia AM, Robertson GA (1998) Regulation of deactivation by an amino terminal domain in *Human ether-a-go-go-related gene* potassium channels. J Gen Physiol 112: 637–647.
23. Wang J, Myers CD, Robertson GA (2000) Dynamic control of deactivation gating by a soluble amino-terminal domain in *HERG* K^+ channels. Biophys J 115: 749–758.
24. Viloria CG, Barros F, Giráldez T, Gómez-Varela D, de la Peña P (2000) Differential effects of amino-terminal distal and proximal domains in the regulation of human *erg* K^+ channel gating. Biophys J 79: 231–246.
25. Alonso-Ron C, de la Peña P, Miranda P, Domínguez P, Barros F (2008) Thermodynamic and kinetic properties of amino-terminal and S4–S5 loop HERG channel mutants under steady-state conditions. Biophys J 94: 3893–3911.
26. Ng CA, Hunter MJ, Perry MD, Mobli M, Ke Y, et al. (2011) The N-terminal tail of hERG contains an amphipathic α-helix that regulates channel deactivation. PloS ONE 6: e16191.
27. Muskett FW, Thouta S, Thomson SJ, Bowen A, Stansfeld PJ, Mitcheson JS (2011) Mechanistic insight into hERG K^+ channel deactivation gating from the solution structure of the eag domain. J Biol Chem 286: 6184–6191.
28. Li Q, Gayen S, Chen AS, Huang Q, Raida M, Kang C (2010) NMR solution structure of the N-terminal domain of hERG and its interaction with the S4–S5 linker. Biochem Biophys Res Commun 403: 126–132.
29. de la Peña P, Alonso-Ron C, Machín A, Fernández-Trillo J, Carretero L, et al. (2011) Demonstration of physical proximity between the amino terminus and the S4–S5 linker of the h-ERG potassium channel. J Biol Chem 286: 19065–19075.
30. Gustina AS, Trudeau MC (2009) A recombinant N-terminal domain fully restores deactivation gating in N-truncated and long QT syndrome mutant hERG potassium channels. Proc Natl Acad Sci USA 106: 13082–13087.
31. Gustina AS, Trudeau MC (2011) hERG potassium channel gating is mediated by N- and C-terminal region interactions. J Gen Physiol 137: 315–325.
32. de la Peña P, Delgado LM, del Camino D, Barros F (1992) Cloning and expression of the thyrotropin-releasing hormone receptor from GH_3 rat anterior pituitary cells. Biochem J 284: 891–899.
33. Barros F, Gómez-Varela D, Viloria CG, Palomero T, Giráldez T, de la Peña P (1998) Modulation of human erg K^+ channel gating by activation of a G protein-coupled receptor and protein kinase C. J Physiol 511: 333–346.
34. Alonso-Ron C, Barros F, Manso DG, Gómez-Varela D, Miranda P, et al. (2009) Participation of HERG channel cytoplasmic structures on regulation by the G protein-coupled TRH receptor. Pflügers Arch 457: 1237–1252.
35. Miranda P, Manso DG, Barros F, Carretero L, Hughes TE, et al. (2008) FRET with multiply labeled HERG K^+ channels as a reporter of the in vivo coarse architecture of the cytoplasmic domains. Biochim Biophys Acta 1783: 1681–1699.
36. Fowler CE, Aryal P, Suen KF, Slesinger PA (2007) Evidence for association of $GABA_B$ receptors with Kir3 channels and regulators of G protein signalling (RGS4) proteins. J Physiol 580: 51–65.
37. Gómez-Varela D, Barros F, Viloria CG, Giráldez T, Manso DG, et al. (2003) Relevance of the proximal domain in the amino-terminus of HERG channels for regulation by a phospholipase C-coupled hormone receptor. FEBS Lett 535: 125–130.
38. Miranda P, Giráldez T, de la Peña P, Manso DG, Alonso-Ron C, et al. (2005) Specificity of TRH receptor coupling to G-proteins for regulation of ERG K^+ channels in GH_3 rat anterior pituitary cells. J Physiol 566: 717–736.
39. Subbiah RN, Clarke CE, Smith DJ, Zhao JT, Campbell TJ, Vandenberg JI (2004) Molecular basis of slow activation of the *human ether-á-go-go* related gene potassium channel. J Physiol 558: 417–431.
40. Saenen JB, Labro AJ, Raes A, Snyders DJ (2006) Modulation of HERG gating by a charge cluster in the N-terminal proximal domain. Biophys J 91: 4381–4391.
41. Ferrer T, Rupp J, Piper DR, Tristani-Firouzi M (2006) The S4–S5 linker directly couples voltage sensor movement to the activation gate in the human ether-a-go-go-related gene (hERG) K^+ channel. J Biol Chem 281: 12858–12864.
42. Liu J, Zhang M, Jiang M, Tseng G-N (2003) Negative charges in the transmembrane domains of the HERG K channel are involved in the activation and deactivation gating processes. J Gen Physiol 121: 599–614.
43. Gómez-Varela D, de la Peña P, García J, Giráldez T, Barros F (2002) Influence of amino-terminal structures on kinetic transitions between several closed and open states in human *erg* K^+ channels. J Membrane Biol 187: 117–133.
44. Chen J, Zou A, Splawski I, Keating MT, Sanguinetti MC (1999) Long QT syndrome-associated mutations in the Per-Arnt-sim (PAS) domain of HERG potassium channels accelerate deactivation. J Biol Chem 274: 10113–10118.
45. Sanguinetti MC, Xu QP (1999) Mutations of the S4–S5 linker alter activation properties of HERG potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes. J Physiol 514: 667–675.
46. Van Slyke AC, Rezazadeh S, Snopkowski M, Shi P, Allard CR, Claydon TW (2010) Mutations within the S4–S5 linker alter voltage sensor constraints in hERG K^+ channels. Biophys J 99: 2841–2852.
47. Axelrod D (2003) Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology. Meth Enzymol 361: 1–33.
48. Selvin PR (1995) Fluorescence resonance energy transfer. Meth Enzymol 246: 300–334.
49. Uversky VN, Dunker AK (2010) Understanding protein non-folding. Biochim Biophys Acta 1804: 1231–1264.
50. Chouard T (2011) Breaking the protein rules. Nature 471: 151–153.
51. Gulbis JM, Zhou M, Mann S, MacKinnon R (2000) Structure of the cytoplasmic ß subunit-T1 assembly of voltage-dependent K^+ channels. Science 289: 123–127.
52. Kobertz WR, Williams C, Miller C (2000) Hanging gondola structure of the T1 domain in a voltage-gated K^+ channel. Biochemistry 39: 10347–10352.
53. Wissmann R, Bildl W, Oliver D, Beyermann M, Kalbitzer H, et al. (2003) Solution structure and function of the "tandem inactivation domain" of the neuronal A-type potassium channel Kv1.4. J Biol Chem 278: 16142–16150.
54. Zagotta WN, Olivier NB, Black KD, Young EC, Olson R, Gouaux E (2003) Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels. Nature 425: 200–205.

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 286, NO. 21, pp. 19065–19075, May 27, 2011
© 2011 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Printed in the U.S.A.

Demonstration of Physical Proximity between the N Terminus and the S4-S5 Linker of the Human *ether-à-go-go*-related Gene (hERG) Potassium Channel*[S]

Received for publication, March 10, 2011, and in revised form, March 31, 2011 Published, JBC Papers in Press, April 7, 2011, DOI 10.1074/jbc.M111.238899

Pilar de la Peña[1], Carlos Alonso-Ron[2], Angeles Machín[3], Jorge Fernández-Trillo[4], Luis Carretero[4], Pedro Domínguez, and Francisco Barros

From the Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Oviedo, 33006 Oviedo, Spain

Potassium channels encoded by the human *ether-à-go-go*-related gene (hERG) contribute to cardiac repolarization as a result of their characteristic gating properties. The hERG channel N terminus acts as a crucial determinant in gating. It is also known that the S4-S5 linker couples the voltage-sensing machinery to the channel gate. Moreover, this linker has been repeatedly proposed as an interaction site for the distal portion of the N terminus controlling channel gating, but direct evidence for such an interaction is still lacking. In this study, we used disulfide bond formation between pairs of engineered cysteines to demonstrate the close proximity between the beginning of the N terminus and the S4-S5 linker. Currents from channels with introduced cysteines were rapidly and strongly attenuated by an oxidizing agent, this effect being maximal for cysteine pairs located around amino acids 3 and 542 of the hERG sequence. The state-dependent modification of the double-mutant channels, but not the single-cysteine mutants, and the ability to readily reverse modification with the reducing agent dithiothreitol indicate that a disulfide bond is formed under oxidizing conditions, locking the channels in a non-conducting state. We conclude that physical interactions between the N-terminal-most segment of the N terminus and the S4-S5 linker constitute an essential component of the hERG gating machinery, thus providing a molecular basis for previous data and indicating an important contribution of these cytoplasmic domains in controlling its unusual gating and hence determining its physiological role in setting the electrical behavior of cardiac and other cell types.

ether-à-go-go-related gene potassium channels play a key role in setting the electrical behavior of a variety of cell types (Refs. 1–3 and references therein). Among other physiological functions, the human *ether-à-go-go*-related gene (hERG[5]; Kv11.1) channel mediates the cardiac repolarizing current (I_{Kr}) (4, 5). Malfunction of hERG due to either pharmacological block by medications or inherited mutations is a major cause of type 2 long-QT syndrome (4, 6–11), a disorder of ventricular repolarization that predisposes affected individuals to ventricular arrhythmia and sudden death (6, 12, 13). The various roles of hERG derive from its unusual gating properties, characterized by slow activation kinetics and a very fast inactivation on depolarization. On the other hand, during repolarization, hERG currents increase due to a fast recovery from inactivation followed by a much slower deactivation. This maintains the channels open during longer periods of time at negative voltages, giving rise to the typical hERG tail currents. In the case of the heart, this contributes to the repolarization of the cardiac action potential and to the prevention of arrhythmias induced by early after-depolarizations or ectopic beats (14, 15).

As for other voltage-dependent potassium channels, the main components of the hERG gating machinery (*e.g.* the voltage-sensing structures and the gate) are located in the transmembrane channel core (16–23). However, it has been demonstrated that the distinctive gating properties of hERG are strongly influenced by other cytoplasmic protein domains. Thus, the important role of the distal *eag*/PAS and exclusive proximal domains of the N terminus in the activation properties and their modulation by hormones has been demonstrated (1, 2, 23–26). It is known that the initial region of hERG N terminus determines its slow deactivation, whereas the proximal domain is the functionally critical region for slowing activation gating (24, 27–33). Also, it has recently been proposed that some residues in the N-terminal portions of the C terminus (either in the named "C-linker" between the last transmembrane segment (S6) and the cyclic nucleotide-binding domain (cNBD) homologous region or in the cNBD itself) could be involved in the control of deactivation gating, possibly through their interaction with the N-terminal-most initial regions of the N terminus (34–36).

Whereas the involvement of the hERG N terminus in the regulation of activation and deactivation gating is largely rec-

* This work was supported in part by Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) Grant BFU2009-11262 and Spanish Ion Channel Initiative (SICI) Consolider-Ingenio Project CSD2008-00005.

[S] The on-line version of this article (available at http://www.jbc.org) contains supplemental Fig. 1.

[1] To whom correspondence should be addressed: Dept. de Bioquímica y Biología Molecular, Ed. Santiago Gascón, University of Oviedo, 33006 Oviedo, Spain. Tel.: 34-985-104-211; Fax: 34-985-103-157; E-mail: pdelapena@uniovi.es.

[2] Present address: Fundación de Investigación Oftalmológica, Instituto Oftalmológico Fernández-Vega, Avda Dres Fernández-Vega s/n., 33012 Oviedo, Asturias, Spain.

[3] Supported by a postdoctoral contract from Spanish Ion Channel Initiative Consolider 2008.

[4] Supported by predoctoral fellowships from the Ministerio de Educación y Ciencia (MEC) and the Fondo de Investigación Científica y Técnica (FICYT) of Spain.

[5] The abbreviations used are: hERG, human *ether-à-go-go*-related gene; cNBD, cyclic nucleotide-binding domain; $TbHO_2$, *tert*-butyl hydroperoxide.

ognized, the molecular basis of this effect is not totally understood. It has been repeatedly proposed that an interaction between N-terminal domains and the S4-S5 linker is the cause of the strong influence exerted by the N terminus in the gating properties (1, 16, 23–25, 27–33, 37–39). Nevertheless, evidence for this interpretation is mostly indirect, including (i) the essential role of the S4-S5 linker coupling voltage sensor activation to the activation gate (38, 40), (ii) the strong parallelism between the alterations in gating caused by mutations in the N terminus and those in the S4-S5 linker (1, 16, 24, 27–33, 37, 41), (iii) the prevention of deactivation slowing by the N terminus after mutation of Gly-546 in the S4-S5 linker to cysteine and its subsequent modification by the addition of the sulfhydryl reagent *N*-ethylmaleimide (29), (iv) the impairment of the cytoplasmic domain-dependent modulation of gating in response to hormonal treatments by single-point mutations in the initial portion of the S4-S5 linker (2), (v) the restoration of slow deactivation gating by the addition of synthetic or recombinant N-terminal domains to channels lacking the N terminus (28, 31, 32), and (vi) the closer positioning of the N-terminal-most segments of the hERG N terminus toward the transmembrane channel core structures compared with other cytoplasmic regions of the channel (3). Note, however, that despite these findings, a direct demonstration of a physical interaction between the distal portion of the N terminus and the S4-S5 linker in the entire channel protein is lacking. Binding of a nonapeptide derived from the S4-S5 linker to the *eag*/PAS domain has been recently reported by NMR titration studies (39). However, in this case, only isolated protein fragments were used, and the peptide specificity of the results was not checked. Therefore, the possibility that the modulation of gating is due to a distant allosteric interaction between these domains cannot be excluded, and the specific details of the putative binding site remain to be determined.

In this study, we used a site-directed cysteine and disulfide chemistry approach (42) to form disulfide cross-links between pairs of introduced cysteines at the beginning of the N terminus and in the S4-S5 linker. Because application of a short peptide corresponding to the first 16 amino acids of hERG is able to restore slow deactivation gating of N-terminally truncated channels (31), and short deletions in the flexible portion at the beginning of the N terminus reproduce the effects on deactivation gating of more extensive N-terminal deletions (29, 31, 33), also mimicking the effect of mutations in the N-terminal portion of the S4-S5 linker (1, 29, 37), we concentrated our work in these regions. Disulfide bonding was detected by measuring the selective, state-dependent, and DTT-reversible elimination of the double-mutant currents under oxidizing conditions, thus demonstrating the proximity between these domains in fully functional channels present on the cell surface.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Reagents and Molecular Biology—The oxidizing agent *tert*-butyl hydroperoxide ($TbHO_2$; Sigma) was diluted in bath solution shortly before experiments. DTT (Sigma and Fluka) was dissolved in the experimental medium immediately before use.

Site-directed mutagenesis using the PCR-based overlap extension method, *in vitro* synthesis of cRNA, and injection of cRNA into *Xenopus laevis* oocytes were performed as described previously (1, 2). Oocytes were injected and incubated in OR-2 medium (82.5 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM $CaCl_2$, 2 mM $MgCl_2$, 1 mM Na_2PO_4, and 10 mM HEPES, pH 7.4) for 2–3 days as described (1, 2).

Electrophysiology—hERG currents were measured in manually defolliculated oocytes with the two-electrode voltage-clamp method as described previously (1, 2, 24, 26). Unless stated otherwise, recordings were obtained in OR-2 medium. Exceptionally (*e.g.* for the P2C/Y542C construct) high-K^+ OR-2 medium in which 50 mM KCl replaced an equivalent amount of NaCl was used to maximize currents of those constructs showing a low level of functional expression. Parallel experiments with several single- and double-cysteine mutants indicated that the extent and kinetics of the oxidation and reduction effects were the same in both solutions. Membrane potential was typically clamped at −80 mV. Where indicated, a holding potential of +40 mV was used to maintain the channels open/inactivated during the oxidation treatments. Ionic currents sampled at 1 kHz were elicited using the voltage protocols indicated in the figures. To prevent any influence of the oxidizing and reducing agents on the silver chloride ground electrodes, they were connected to the bath chamber through agar bridges. Stimulation and data acquisition were controlled with Pulse+PulseFit software (HEKA Elektronik, Lambrecht, Germany) running on Macintosh computers.

Data Analysis—Data analysis and exponential fits to ionic currents and time courses were performed with the programs PulseFit (HEKA Elektronik) and Igor-Pro (WaveMetrics, Lake Oswego, OR). Current kinetic parameters were obtained as described previously (1, 2, 24, 26).

Data values given in the text and in the figures with *error bars* represent the mean ± S.E. for the number of indicated cells. Comparisons between data groups were at first performed by parametric Student's impaired *t* test (two-tailed). When significant differences in S.D. were present, an alternate Welch's test or non-parametric Wilcoxon or Mann-Whitney test was also used. In all cases, p values <0.05 were considered as indicative of statistical significance.

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of Oxidation-Reduction on Single- and Double-cysteine hERG Mutants in the N Terminus and the S4-S5 Linker—The existence of an interaction between the N-terminal domains and the S4-S5 linker of hERG has been repeatedly related to modulation of activation and deactivation gating by the N terminus (1, 16, 23–25, 27–33, 37–39). However, apart from indirect evidence provided mainly by the similar deactivation properties caused by structural modifications in both domains (1–3, 16, 24, 27–33, 37, 38, 40, 41), direct proof of such an interaction is still lacking. Site-directed cysteine and disulfide chemistry can be used to map out contacts between pairs of positions or to demonstrate the physical proximity between protein sequences carrying the pair of introduced cysteines (42). Therefore, we introduced cysteines into specific positions of the distal portion of the hERG N terminus and the S4-S5 linker, either singly or simultaneously, and then applied the membrane-permeable oxidizing agent $TbHO_2$ to oocytes expressing the constructs to

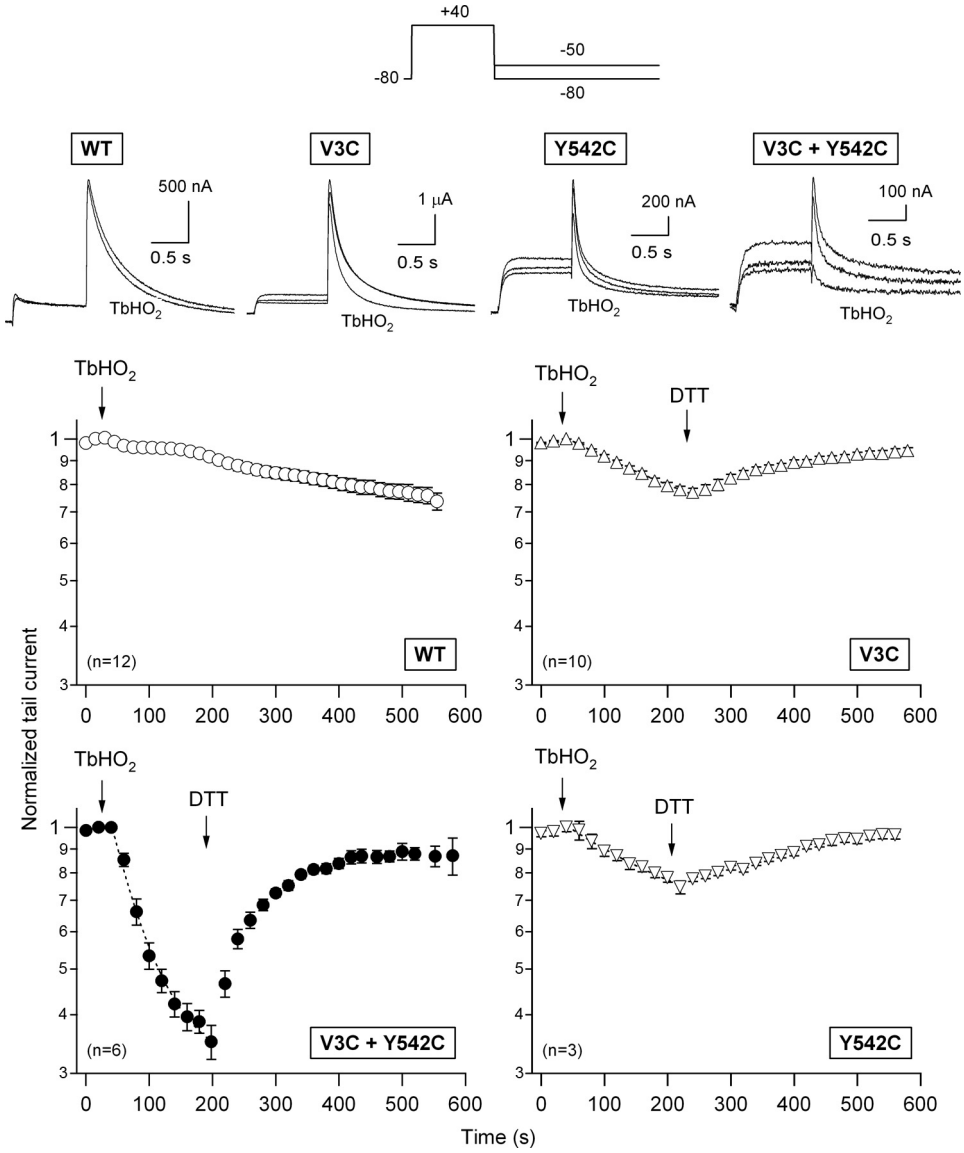


FIGURE 1. **Effect of extracellularly applied $TbHO_2$ and DTT on hERG currents.** The pulse protocol used to activate/inactivate and deactivate hERG channels expressed in *Xenopus* oocytes is shown at the top. Tail currents were recorded during repolarizations to −80 mV (WT) or −50 mV (mutants) to compensate for the faster deactivation of the N-terminal and S4-S5 linker mutants. These repolarizations followed 1-s depolarizing steps to +40 mV from a holding potential of −80 mV. Following stabilization of the tail currents, 2 mM $TbHO_2$ and 5 mM DTT were applied as indicated. The time course of peak tail current variation was followed for ~10 min. Data corresponding to channels carrying single-cysteine substitutions at residues 3 and 542 of the hERG sequence and to the double-cysteine mutant V3C/Y542C are illustrated in the graphs. Data points represent the mean ± S.E. of current magnitudes normalized to the value obtained immediately before $TbHO_2$ addition. Monoexponential fits are shown superimposed on the data during the $TbHO_2$ treatment. Superposition of two (WT) or three (mutants) current sweeps before, 3 min after application of $TbHO_2$, and 5 min after the addition of DTT are shown in the *insets*. The *lower trace* always corresponds to $TbHO_2$ treatment.

study the effects of redox-dependent disulfide bonding between the respective cysteines.

The hERG sequence contains 24 endogenous cysteines. Ten of them are located in the *eag*/PAS (eight cysteines) and proximal (two cysteines) domains of the N terminus. Two cysteines are in the extracellular S1-S2 linker, and three are in the S5 and S6 transmembrane helices. The remaining nine cysteines are in the C terminus: four in the C-linker, one in the cNBD, and four in the distal half of the C terminus. However, at least under the experimental conditions used here, these native cysteines are functionally "silent" because the WT hERG currents decreased only minimally and very slowly following treatment with $TbHO_2$ (Fig. 1). The activation and deactivation properties of the WT channels were not appreciably altered by oxidation (data not shown) (43, 44). Introduction of a single-cysteine residue at the beginning of the N terminus (*e.g.* in mutant V3C; see also below) slightly but consistently increased the $TbHO_2$-induced inhibition of the hERG tail current (from a normalized I_{tail} decrease of 5.9 ± 1.5% ($n = 12$) in the WT to 21.2 ± 1.6% ($n = 10$) in V3C channels following a 3-min $TbHO_2$ treatment; $p < 0.001$). A similar effect was obtained in response to $TbHO_2$ when a single cysteine was introduced into the N-terminal portion of the S4-S5 linker (mutant Y542C) (Fig. 1). In this case, the tail current was reduced by 25.4 ± 3.0% ($n = 3$; $p < 0.001$ *versus* the WT). The evolution of these effects was slow, with estimated time constants of 318 ± 22 and 220 ± 44 s for the V3C

and Y542C channels, respectively. By contrast, the current mediated by a construct carrying two engineered cysteines at Val-3 and Tyr-542 (double mutant V3C/Y542C) (Fig. 1) was rapidly and strongly reduced by $TbHO_2$. Thus, an inhibition time constant of 57.5 ± 2.8 s ($n = 6$) was observed, and the I_{tail} decrease amounted to 65 ± 2.9% following a 3-min treatment ($p < 0.001$ *versus* the WT, V3C, and Y542C alone). Noticeably, the kinetic properties of the small residual currents after oxidation closely resemble those of the original ones before adding the oxidizing agent (supplemental Fig. 1). Therefore, the observed reductions are not due to a kinetic shift that minimizes the size of the currents exclusively at the potentials used for the measurements. Even though other mechanistic interpretations could be possible (*e.g.* that oxidation-induced modifications of V3C and Y542C synergistically interact), these results clearly suggest that disulfide bonding between Cys-3 and Cys-542 occurs, thus compromising activation gating and locking a substantial fraction of channels in a non-conducting state.

If the diminished opening of the oxidized double-cysteine mutant resulted from formation of a disulfide bond, then the effect should be readily reversible by application of DTT, a reducing agent whose only action should be to break disulfide bonds (40, 43–45). Changing to normal extracellular solution following the treatment with $TbHO_2$ did not appreciably reverse the inhibitory effect of the oxidizing agent (data not shown). Also, no measurable effects of DTT were observed when the reducing agent was directly applied to oocytes expressing either the WT or double-mutant channels (data not shown), indicating that disulfide bonds were not present under control conditions, perhaps due to the reducing environment of the oocyte interior. However, as shown in Fig. 1, the $TbHO_2$-induced reduction of the V3C/Y542C current was rapidly (recovery time constant of 75.2 ± 7.3 s) and almost completely reversed when 5 mM DTT was substituted for the oxidizing agent in the external medium. Thus, a steady-state current level amounting to 83 ± 8% of the initial control value was attained in the presence of the reducing agent. This also suggests that the effect of the oxidizing agent was not due to a nonspecific disruption of the cell integrity.

It is interesting to note that we were unable to observe any consistent pattern of DTT effects on the otherwise very small response to $TbHO_2$ of the WT-expressing oocytes (data not shown). However, the addition of the reducing agent reversed the effect caused by the oxidation of the V3C (75 ± 7% reversal) and Y542C (84 ± 8% reversal) mutant channels (Fig. 1). Even though the kinetics of this reversion were markedly slower than those observed with the double-mutant construct (recovery time constants of 172 ± 6 and 500 ± 198 s for the V3C and Y542C channels, respectively; $p < 0.001$), these data raised the possibility that, albeit with smaller effectivity and/or reduced functional impact, a disulfide bond could also be forming between the cysteines at these positions and an endogenous cysteine in the channel. Unfortunately, both a multiple mutant without any native cysteine in the N terminus and an hERG construct lacking extensive regions of the C terminus yielded electrophysiologically non-functional channels (see also Ref. 35). Therefore, we generated a battery of single- and double-point mutants from which most of the endogenous cysteines present in the intracellular domains of hERG were removed and combined them with the V3C mutation. The effect caused by $TbHO_2$-induced oxidation of these constructs is summarized in Fig. 2.

It has been recently shown that the cysteines located at positions 723 and 740 of the C-linker between the pore domain and the cytoplasmic cNBD are important for hERG function alterations caused by oxidative stress in HEK293 cells expressing the channel (35). We checked the possible implication of these residues in the slight inhibition induced by $TbHO_2$ in the single-point mutants (*e.g.* V3C) under our experimental conditions, also trying to minimize the possible contribution of these endogenous cysteines to the oxidation effect. For this purpose, we initially used two triple mutants carrying the V3C mutation but also lacking the endogenous cysteines at either positions 723 and 729 or positions 740 and 750. As shown in Fig. 2 (*A–C*), the small current inhibition elicited by the oxidizing agent in the V3C construct remained almost unaltered in mutants V3C/C723G/C729G and V3C/C740G/C750G.

In an additional set of experiments, oxidation of oocytes expressing quadruple mutants with two engineered cysteines at positions 3 and 542 but also with Cys-723 and Cys-729 or Cys-740 and Cys-750 changed to glycine (mutants V3C/Y542C/C723G/C729G and V3C/Y542C/C740G/C750G) rapidly and markedly lowered the current level. Thus, the level of inhibition and the inhibition time constant amounted to 76.8 ± 2.0% and 62.5 ± 5.6 s for the V3C/Y542C/C723G/C729G channels ($n = 4$; $p < 0.05$). These values corresponded to 69.9 ± 1.9% and 60 ± 9.7 s for V3C/Y542C/C740G/C750G ($n = 3$). Also, DTT largely reversed the oxidation effect in these constructs (91 ± 3.3 and 78 ± 2.1%, respectively). This reversion was also fast, with measured recovery time constants of 81.2 ± 11.0 and 83.3 ± 4.6 s, respectively. The reason for the slightly increased current attenuation by oxidation of channels carrying Cys-3 and Cys-542 but also lacking Cys-723 and Cys-729 is not known. It is possible that Cys-723 and Cys-729 are located near residues 3 and 542 in the channel structure, providing a competing environment for faster and more complete formation of disulfide products between Cys-3 and Cys-542 in the V3C/Y542C mutant (42).

Altogether, these data indicate that if Cys-3 establishes a cross-link with an endogenous cysteine, it is not any of the C-linker cysteines located at positions 723, 729, 740, and 750. They also demonstrate that for the prominent redox effects observed in the double mutant V3C/Y542C, these endogenous C-linker cysteines are not necessary.

In an additional attempt to analyze the reduced effect of $TbHO_2$ on the single-cysteine mutant V3C, we also combined it with a C-terminal deletion (mutant V3CΔ864–1010) in which elimination of residues 863 and 1011 removed the cysteines at positions 977 and 984 of the hERG sequence. This deletion did not appreciably modify the expression or electrophysiological properties of the channel (data not shown). An effect similar to that obtained with the V3C mutant was observed after the addition of $TbHO_2$ to the V3CΔ864–1010 construct (Fig. 2, *A* and *D*).

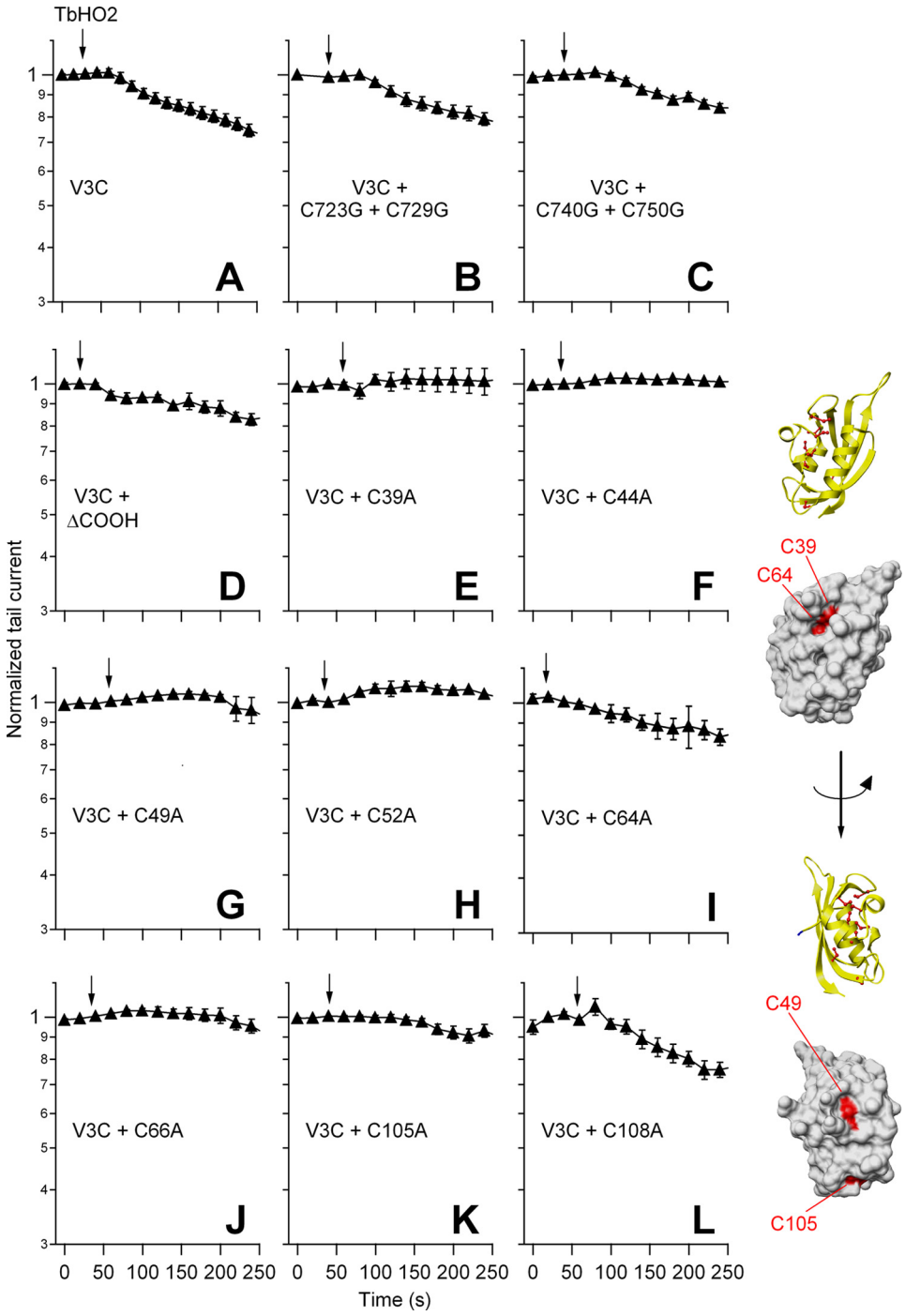


FIGURE 2. **Effect of $TbHO_2$ on V3C mutant channels in the presence or absence of endogenous cysteine residues.** The time course of normalized peak tail current variation after perfusion of 2 mM $TbHO_2$ (*arrows*) is shown. The identity of the single-, double-, and triple-mutant channel constructs is indicated in *A–C* and *E–L*. Data corresponding to a construct in which mutation V3C was combined with a C-terminal deletion removing residues 864–1010 (V3CΔCOOH) are shown in *D*. Averaged data from 5–10 oocytes are shown. Ribbon and surface representations of a single hERG *eag*/PAS domain corresponding to the x-ray tridimensional structure from Morais Cabral *et al.* (28) are shown on the *right*. The eight cysteines present in this channel region are shown in ball-and-stick representation in the ribbon diagrams. The positions of the four cysteine side chains (residues 39, 49, 64, and 105) that show up on the surface of the domain are highlighted in *red*. Note that the initial 26 residues of the hERG sequence not ordered in the crystal structure do not appear in the diagrams. Molecular graphic images were produced using the UCSF Chimera package from the Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco.

Finally, we also created a set of double mutants in which the cysteine at position 3 was combined with a Cys-to-Ala mutation of every single cysteine of the *eag*/PAS domain. As shown in Fig. 2 (*E–L*), the absence of a cysteine at position 39, 44, 49, 52, 66, or 105 caused a reduction of the $TbHO_2$-induced current inhibition compared with that observed in the single mutant V3C. However, an effect of the oxidizing agent equivalent to that in the V3C mutant was obtained for the V3C/C64A and V3C/C108A mutants. The fact that elimination of several of the *eag*/PAS endogenous cysteines minimized the oxidation

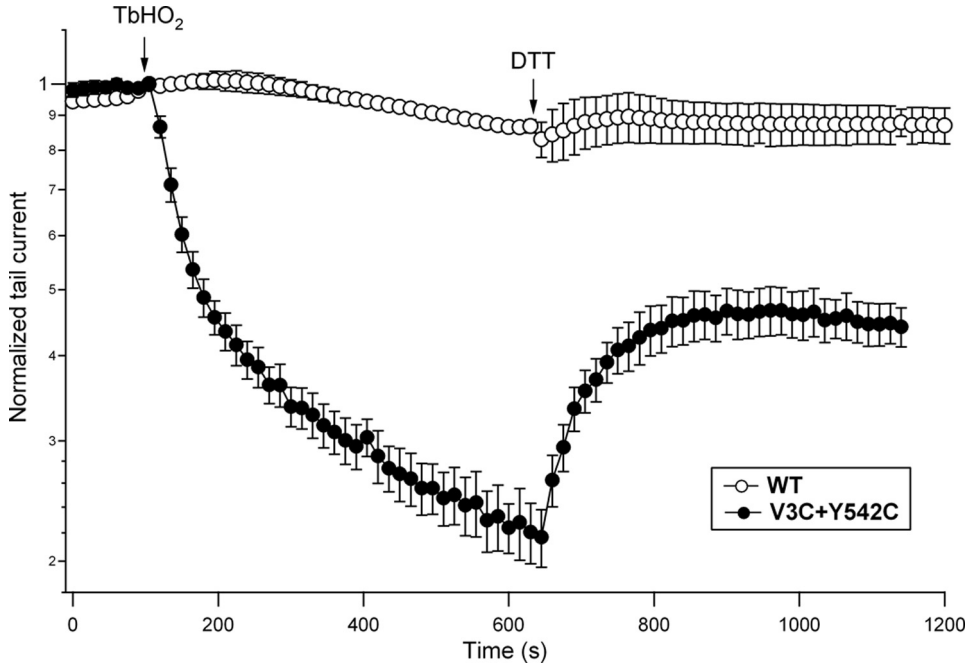


FIGURE 3. **Long-term evolution of the redox effects on hERG currents.** Peak tail currents were recorded from oocytes expressing WT (○) and V3C/Y542C (●) channels as described in the legend to Fig. 1. An extended treatment of ~10 min with 2 mM $TbHO_2$ was performed, followed by a period of perfusion without the oxidizing agent in which 20 mM DTT was substituted for 10 mM NaCl in OR-2 medium. Averaged data from four oocytes are shown.

effect on V3C channels could be interpreted as an indication that some interaction takes place between residues at these positions and the cysteine at position 3. However, similar results were observed upon thiol removal from amino acids such as Cys-39, Cys-49, and Cys-105 carrying side chains exposed to the surface of the *eag*/PAS crystalline structure (Fig. 2, *inset*) and from Cys-44, Cys-52, and Cys-66, localized in the domain core. Also, no change of the oxidizing agent effect was attained in mutants V3C/C64A and V3C/ C108A, even though Cys-64 and Cys-108 are indeed located in the periphery of the *eag*/PAS domain. Thus, it is likely that the effect of *eag*/PAS cysteine substitutions is indirectly due to a modification of the domain architecture and not to rupture of a disulfide bond between them and the cysteine introduced at position 3. Therefore, we next concentrated our efforts in further exploring the disulfide bond-related consequences of oxidation using double-cysteine mutants in both the N-terminal region and the S4-S5 linker.

Specificity of the Oxidation Effects—Careful inspection of the V3C/Y542C current attenuation after $TbHO_2$ addition indicated an apparent slowing of current inhibition at the latter time points of the $TbHO_2$ treatment (Fig. 1). Prolongation of the oxidizing agent treatment to 10 min more clearly revealed the slowed second phase of the $TbHO_2$ effect (Fig. 3). However, the enhancement of current inhibition was paralleled by a subsequent decrease in the fraction of current that could be recovered by the addition of DTT, even at the highest concentration used (20 mM). This indicates that non-disulfide products (*e.g.* sulfinic and sulfenic oxyacids) due to slower and DTT-irreversible oxidative reactions (42) can also accumulate after these long $TbHO_2$ treatments. Therefore, quantification of the oxidizing agent effects was systematically performed after 2–3-min treatments, followed by a phase of reversion with DTT.

One remarkable property of the disulfide chemistry approach is its dependence on the spatial proximity between the disulfide-forming pairs of residues. Besides variations due to structural fluctuations in separated but particularly flexible protein segments, rapid and extensive reactivity of cysteine pairs can be used as a good signature of such proximity (42). As a corollary, differences in the rate, extent, and reversal of the disulfide bond-forming reactions due to variations in the cysteine pairs can be used as an indication of specificity, particularly for adjacent positions of the same protein region. Oxidation of single-cysteine mutants at positions 4, 5, 6, and 8 of the N terminus yielded results analogous to those obtained with the single V3C mutant. Almost no effect of the oxidizing agent was observed with the S4-S5 single-cysteine mutant G546C (data not shown). Therefore, we tested the influence of changing the position of the cysteine pairs by modifying the locations of the cysteines both in the N terminus and in the S4-S5 linker.

The extent of the $TbHO_2$-induced inhibition of the hERG currents was maximal for cysteine pairs at position 3 or 4 of the N-terminal region and position 542 of the S4-S5 linker (Fig. 4). When the Cys-542 mutation was combined with a second cysteine at position 2, 5, 6, or 8 of the N terminus, the current inhibition was substantially reduced. Thus, only half of the attenuation of the double mutants V3C/Y542C and R4C/ Y542C was observed with respect to the single mutations V3C and Y542C (Fig. 5). A similarly small current inhibition was observed when the cysteine at position 3 was combined with a cysteine at position 545 of the S4-S5 linker. Furthermore, the $TbHO_2$-induced current attenuation was virtually abolished in the double mutant V3C/G546C. Noticeably, the double mutants carrying cysteine pairs at position 3 or 4 and position 542 also showed maximal speed of inhibition, which was followed by a faster and almost complete reversal upon DTT addition.

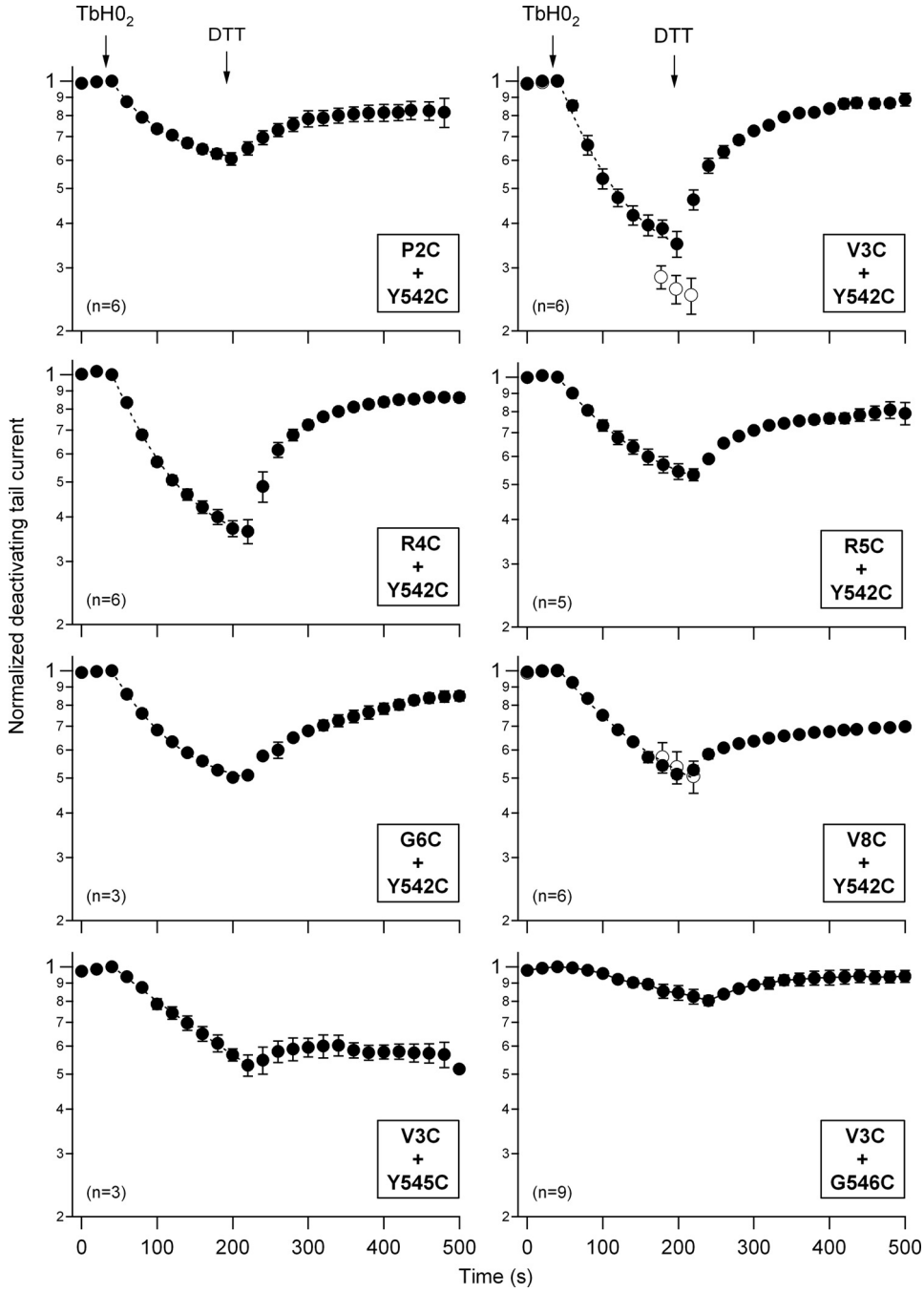


FIGURE 4. **Specificity of the redox effects as a function of the location of double-cysteine mutations.** The time course of the hERG current tail variations was followed upon the addition of 2 mM $TbHO_2$ and 5 mM DTT as indicated. Oocytes were bathed in standard OR-2 medium, except for the P2C/Y542C mutant, for which high-K^+ OR-2 medium (see "Experimental Procedures") was used because of the low expression level of this construct. Monoexponential fits are shown superimposed on the data during the $TbHO_2$ treatment. ○ (panels corresponding to mutants V3C/Y542C and V8C/Y542C), current level in a second set of oocytes following an oxidation period of 3 min in which test pulses were not applied to follow the evolution of the currents.

These kinetic parameters were substantially reduced either by changing the cysteine introduced into the N-terminal region at the beginning of the N terminus at position 2, 5, 6, and 8 or by using a combination of cysteine at position 3 with cysteines at positions 545 and 546. Altogether, these data further indicate that the oxidation effect leading to disulfide bond formation is maximal for those cysteine pairs located around amino acid 3 of the N terminus and amino acid 542 of the S4-S5 linker in the hERG sequence.

State Dependence of the Oxidation Effects—As a last indication of specificity and strong spatial dependence of the oxidation effects, we studied the state dependence of the current reductions induced by $TbHO_2$. The amount of the $TbHO_2$-induced V3C/Y542C current inhibition was significantly enhanced after 2–3 min of treatment when cells maintained at a holding potential of −80 mV were not repeatedly depolarized with the pulses to +40 mV used to analyze the time course of the oxidation effects (Fig. 4). This suggests that conformational

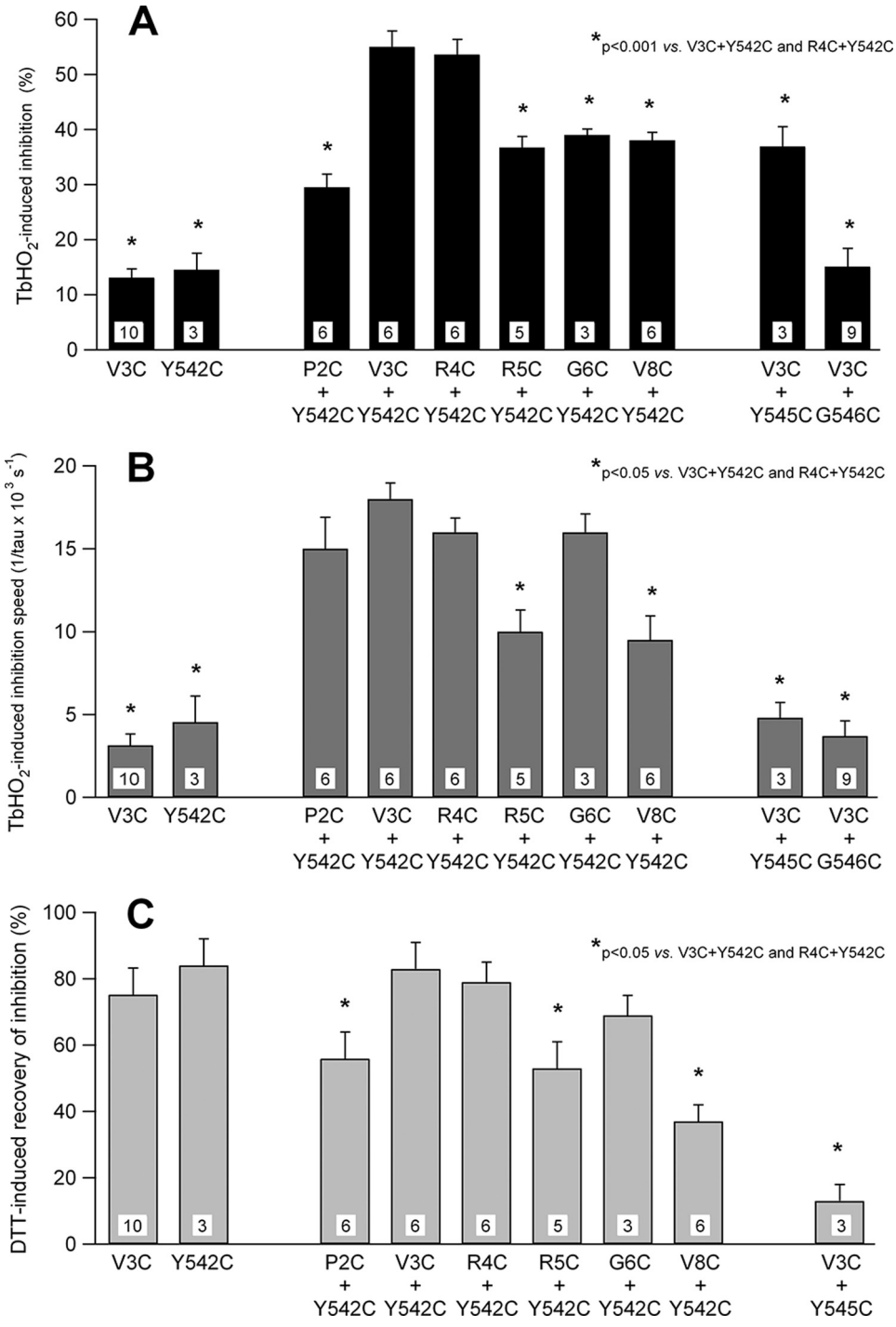


FIGURE 5. **Summary of the $TbHO_2$- and DTT-induced effects on hERG tail currents.** *A*, quantification of the $TbHO_2$-induced inhibition following a 3-min treatment with the oxidizing agent. The 5.9% inhibition measured in the non-mutated WT channels has been subtracted from the data. *B*, comparison of $TbHO_2$-induced inhibition rates. The speed of inhibition of the different constructs is compared as measured by the inverse value of the time constant obtained from monoexponential fits to the inhibitory phase upon the addition of $TbHO_2$. *C*, reversibility of the oxidation effect in the presence of DTT.

rearrangements during closed-to-open transitions are not essential for disulfide bond formation. Such enhancement was not observed with the V8C/Y542C pair. By contrast, holding the cell at +40 mV during the application of the oxidizing agent, therefore maintaining the channels in the open/inactivated state, markedly reduced the $TbHO_2$-induced inhibition of the V3C/Y542C currents (Fig. 6). This reduction was even more prominent when the V3C/Y542C channels were continuously maintained in the open/inactivated state at +40 mV during $TbHO_2$ treatment without repeatedly applying the hyperpolarizations used to follow the temporal evolution of the tail currents. Finally, no differences in the oxidation effects were observed when cells expressing the double-cysteine mutant G6C/Y542C were held at −80 mV (closed) or +40 mV (open/inactivated) during the application of $TbHO_2$.

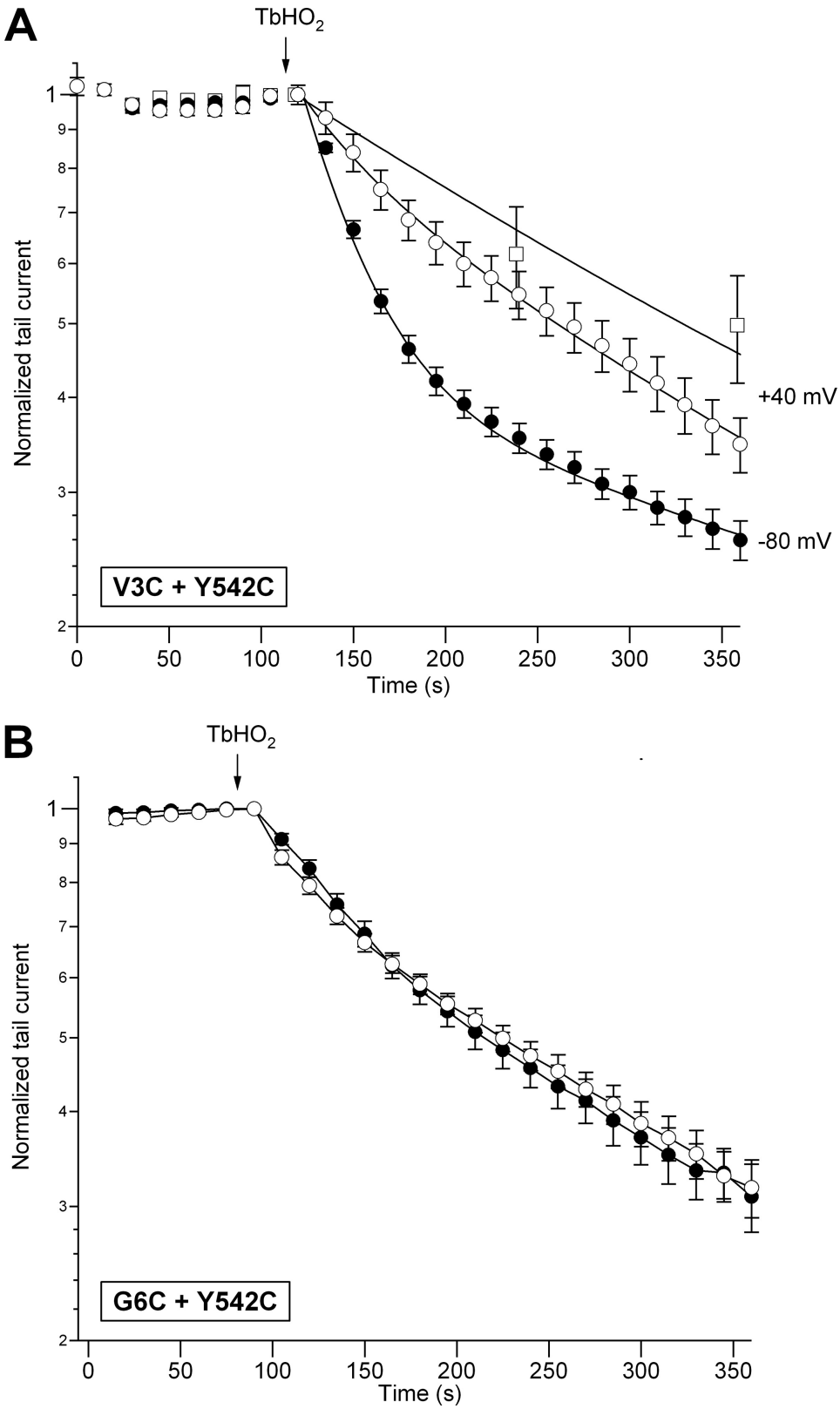


FIGURE 6. **State dependence of the $TbHO_2$-induced effect.** *A*, time course of V3C/Y542C peak tail current variation in response to $TbHO_2$. Peak tail currents were measured as described in the legend to Fig. 1 during repolarization steps applied at the indicated intervals from holding potentials of −80 mV (●) and +40 mV (○ and □). The magnitude of the peak tail currents was estimated at 15-s intervals (● and ○) or without continuous pulsing (□). The *continuous lines* correspond to exponential curves that best fit the data. Long treatments with the oxidizing agent were used to fit the data at +40 mV, but only data during the initial period of recording are shown for clarity. *B*, independence of the $TbHO_2$-induced effect on the conformational state of the G6C/Y542C channel. Channels were held closed at −80 mV (●) or open/inactivated at +40 mV (○) during the application of $TbHO_2$ as indicated in *A*. Note that, in this case, the inhibition kinetics superimpose onto the slow time course observed with V3C/Y542C channels held at +40 mV.

Formation of a disulfide bond requires close proximity between the sulfhydryl groups, meaning that cysteine residues separated by >7 Å would require motion of the protein backbone for disulfide cross-linkage (42, 46). However, it is difficult to translate our data to real distances because the probability of collision between the cysteine pairs forming disulfide bonds is greatly increased by fluctuations of otherwise flexible structures, even though they are located at a certain distance (40, 42, 45–47). There is evidence that the N-terminal-most segments of the hERG N terminus and the S4-S5 linker constitute highly flexible and/or unstructured regions (28, 33, 36, 39). The protein regions studied here are expected to be dynamically modulated during channel function, so it could be expected that collisions between the cysteine pairs may also be influenced by the molecular rearrangements associated with gating. Finally, some influence of the relatively slow permeation of redox reagents into the cells on the quantitative interpretation of our disulfide bond formation rates cannot be completely excluded.

The state-dependent modification of the V3C/Y542C mutant, but not the single-cysteine mutant channels, and the ability to readily reverse modification with the reducing agent DTT indicate that a disulfide bond is formed under oxidizing conditions between the N-terminal-most region of the N terminus and the S4-S5 linker, locking the channels in a non-conducting state. The covalent lock of the channels closed also indicates that the initial segment of the N terminus and the S4-S5 linker interact in the closed state. This would be consistent with our previous demonstration that the N-terminal-most region of the N terminus also plays a relevant role in activation properties (1). It would also be consistent with the reported ability of the Y542C mutation to positively shift the steady-state activation $V_{0.5}$ and its less negative ΔG_o, indicating a shift in the equilibrium toward the closed state (1).

It should be emphasized that our data do not exclude a contribution of other cytoplasmic structures (*e.g.* the PAS domain and the C-linker plus cNBD) to control gating via direct or indirect/allosteric interactions with the S4-S5 linker or other components of the gating machinery. Note that the most widely recognized effect of the N terminus is its contribution to slow deactivation gating, presumably also through an interaction with the S4-S5 linker that stabilizes the open state. Although we concentrated our efforts on the N-terminal segments or the N terminus and the S4-S5 linker, further work would be necessary to determine whether different regions of this linker (1, 2, 38, 48) and the structurally and functionally differentiated portions of the N terminus also contribute in specific ways to the protein-protein interactions that modulate gating. Note also that whereas an interaction of the S4-S5 linker with other gating components (*e.g.* the channel gate) seems to take place only in the closed state in hERG and KCNQ1 channels, the opposite happens in KAT1 and HCN channels, bearing a substantial homology to hERG in some cytoplasmic domains, and both open and closed state interactions take place between the same regions in *Shaker*-like potassium channels (49).

In this context, we propose that the physical interactions detected here between the N-terminal-most segments of the N terminus and the S4-S5 linker can be viewed as part of a global interaction network in which other cytoplasmic regions such as the PAS and proximal domains of the N terminus, the C-terminal portion of the sixth transmembrane segment, and the C-terminal C-linker and cNBD dynamically contribute to modulate channel gating. The functional consequence of these interactions on activation and deactivation and on inactivation gating (29, 50) can vary according to the channel type, the relative positioning of the N- and C-terminal portions, and the presence of additional auxiliary subunits.

In summary, our study provides, for the first time, direct evidence that a close proximity exists between the N-terminal-most region of the N terminus and the S4-S5 linker of hERG, which may allow for a physical interaction between these cytoplasmic domains. Therefore, it sheds significant new insight into the molecular basis of the protein-protein interactions between the N-terminal distal regions and the S4-S5 linker involved in the control of gating properties and hormonal modulation of hERG (1, 2, 24, 27–33, 36).

Acknowledgments—We thank Dr. Kevin Dalton for editing the manuscript. The Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco, is supported by National Institutes of Health Grant P41 RR001081.

REFERENCES

1. Alonso-Ron, C., de la Peña, P., Miranda, P., Domínguez, P., and Barros, F. (2008) *Biophys. J.* **94,** 3893–3911
2. Alonso-Ron, C., Barros, F., Manso, D. G., Gómez-Varela, D., Miranda, P., Carretero, L., Domínguez, P., and de la Peña, P. (2009) *Pflügers Arch.* **457,** 1237–1252
3. Miranda, P., Manso, D. G., Barros, F., Carretero, L., Hughes, T. E., Alonso-Ron, C., Domínguez, P., and de la Peña, P. (2008) *Biochim. Biophys. Acta* **1783,** 1681–1699
4. Sanguinetti, M. C., Jiang, C., Curran, M. E., and Keating, M. T. (1995) *Cell* **81,** 299–307
5. Trudeau, M. C., Warmke, J. W., Ganetzky, B., and Robertson, G. A. (1995) *Science* **269,** 92–95
6. Viskin, S. (1999) *Lancet* **354,** 1625–1633
7. Chiang, C. E., and Roden, D. M. (2000) *J. Am. Coll. Cardiol.* **36,** 1–12
8. Keating, M. T., and Sanguinetti, M. C. (2001) *Cell* **104,** 569–580
9. Redfern, W. S., Carlsson, L., Davis, A. S., Lynch, W. G., MacKenzie, I., Palethorpe, S., Siegl, P. K., Strang, I., Sullivan, A. T., Wallis, R., Camm, A. J., and Hammond, T. G. (2003) *Cardiovasc. Res.* **58,** 32–45
10. Thomas, D., Zhang, W., Wu, K., Wimmer, A. B., Gut, B., Wendt-Nordahl, G., Kathöfer, S., Kreye, V. A., Katus, H. A., Schoels, W., Kiehn, J., and Karle, C. A. (2003) *Cardiovasc. Res.* **59,** 14–26
11. Finlayson, K., Witchel, H. J., McCulloch, J., and Sharkey, J. (2004) *Eur. J. Pharmacol.* **500,** 129–142
12. Roden, D. M., Lazzara, R., Rosen, M., Schwartz, P. J., Towbin, J., and Vincent, G. M. (1996) *Circulation* **94,** 1996–2012
13. Schwartz, P. J. (2005) *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* **2,** 346–351
14. Smith, P. L., Baukrowitz, T., and Yellen, G. (1996) *Nature* **379,** 833–836
15. Lu, Y., Mahaut-Smith, M. P., Varghese, A., Huang, C. L., Kemp, P. R., and Vandenberg, J. I. (2001) *J. Physiol.* **537,** 843–851
16. Liu, J., Zhang, M., Jiang, M., and Tseng, G. N. (2003) *J. Gen. Physiol.* **121,** 599–614
17. Subbiah, R. N., Clarke, C. E., Smith, D. J., Zhao, J., Campbell, T. J., and Vandenberg, J. I. (2004) *J. Physiol.* **558,** 417–431
18. Subbiah, R. N., Kondo, M., Campbell, T. J., and Vandenberg, J. I. (2005) *J. Physiol.* **569,** 367–379
19. Zhang, M., Liu, J., Jiang, M., Wu, D. M., Sonawane, K., Guy, H. R., and Tseng, G. N. (2005) *J. Membr. Biol.* **207,** 169–181
20. Smith, P. L., and Yellen, G. (2002) *J. Gen. Physiol.* **119,** 275–293
21. Piper, D. R., Varghese, A., Sanguinetti, M. C., and Tristani-Firouzi, M.

(2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100,** 10534–10539
22. Zhang, M., Liu, J., and Tseng, G. N. (2004) *J. Gen. Physiol.* **124,** 703–718
23. Saenen, J. B., Labro, A. J., Raes, A., and Snyders, D. J. (2006) *Biophys. J.* **91,** 4381–4391
24. Viloria, C. G., Barros, F., Giráldez, T., Gómez-Varela, D., and de la Peña, P. (2000) *Biophys. J.* **79,** 231–246
25. Gómez-Varela, D., de la Peña, P., García, J., Giráldez, T., and Barros, F. (2002) *J. Membr. Biol.* **187,** 117–133
26. Gómez-Varela, D., Barros, F., Viloria, C. G., Giráldez, T., Manso, D. G., Dupuy, S. G., Miranda, P., and de la Peña, P. (2003) *FEBS Lett.* **535,** 125–130
27. Spector, P. S., Curran, M. E., Zou, A., Keating, M. T., and Sanguinetti, M. C. (1996) *J. Gen. Physiol.* **107,** 611–619
28. Morais Cabral, J. H., Lee, A., Cohen, S. L., Chait, B. T., Li, M., and Mackinnon, R. (1998) *Cell* **95,** 649–655
29. Wang, J., Trudeau, M. C., Zappia, A. M., and Robertson, G. A. (1998) *J. Gen. Physiol.* **112,** 637–647
30. Chen, J., Zou, A., Splawski, I., Keating, M. T., and Sanguinetti, M. C. (1999) *J. Biol. Chem.* **274,** 10113–10118
31. Wang, J., Myers, C. D., and Robertson, G. A. (2000) *Biophys. J.* **115,** 749–758
32. Gustina, A. S., and Trudeau, M. C. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106,** 13082–13087
33. Ng, C. A., Hunter, M. J., Perry, M. D., Mobli, M., Ke, Y., Kuchel, P. W., King, G. F., Stock, D., and Vandenberg, J. I. (2011) *PLoS ONE* **6,** e16191
34. Al-Owais, M., Bracey, K., and Wray, D. (2009) *Eur. Biophys. J.* **38,** 569–576
35. Kolbe, K., Schönherr, R., Gessner, G., Sahoo, N., Hoshi, T., and Heinemann, S. H. (2010) *J. Physiol.* **588,** 2999–3009
36. Muskett, F. W., Thouta, S., Thomson, S. J., Bowen, A., Stansfeld, P. J., and Mitcheson, J. S. (2011) *J. Biol. Chem.* **286,** 6184–6191
37. Sanguinetti, M. C., and Xu, Q. P. (1999) *J. Physiol.* **514,** 667–675
38. Van Slyke, A. C., Rezazadeh, S., Snopkowski, M., Shi, P., Allard, C. R., and Claydon, T. W. (2010) *Biophys. J.* **99,** 2841–2852
39. Li, Q., Gayen, S., Chen, A. S., Huang, Q., Raida, M., and Kang, C. (2010) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **403,** 126–132
40. Ferrer, T., Rupp, J., Piper, D. R., and Tristani-Firouzi, M. (2006) *J. Biol. Chem.* **281,** 12858–12864
41. Schönherr, R., and Heinemann, S. H. (1996) *J. Physiol.* **493,** 635–642
42. Bass, R. B., Butler, S. L., Chervitz, S. A., Gloor, S. L., and Falke, J. J. (2007) *Methods Enzymol.* **423,** 25–51
43. Liu, J., Zhang, M., Jiang, M., and Tseng, G. N. (2002) *J. Gen. Physiol.* **120,** 723–737
44. Brown, S., Sonntag, D. P., and Sanguinetti, M. C. (2008) *Cell Physiol. Biochem.* **22,** 601–610
45. Bell, D. C., Turbendian, H. K., Valley, M. T., Zhou, L., Riley, J. H., Siegelbaum, S. A., and Tibbs, G. R. (2009) *Pflügers Arch.* **458,** 259–272
46. Falke, J. J., Dernburg, A. F., Sternberg, D. A., Zalkin, N., Milligan, D. L., and Koshland, D. E., Jr. (1988) *J. Biol. Chem.* **263,** 14850–14858
47. Horenstein, J., Wagner, D. A., Czajkowski, C., and Akabas, M. H. (2001) *Nat. Neurosci.* **4,** 477–485
48. Ju, P., Pages, G., Riek, R. P., Chen, P. C., Torres, A. M., Bansal, P. S., Kuyucak, S., Kuchel, P. W., and Vandenberg, J. I. (2009) *J. Biol. Chem.* **284,** 1000–1008
49. Choveau, F. S., Rodriguez, N., Ali, F. A., Labro, A. J., Rose, T., Dahimène, S., Boudin, H., Le Hénaff, C., Escande, D., Snyders, D. J., Charpentier, F., Mérot, J., Baró, I., and Loussouarn, G. (2011) *J. Biol. Chem.* **286,** 707–716
50. Barghaan, J., and Bähring, R. (2009) *J. Gen. Physiol.* **133,** 205–224

Pflugers Arch - Eur J Physiol (2012) 463:685–702
DOI 10.1007/s00424-012-1094-y

ION CHANNELS, RECEPTORS AND TRANSPORTERS

Cell type influences the molecular mechanisms involved in hormonal regulation of ERG K^+ channels

Luis Carretero · Francisco Barros · Pablo Miranda · Jorge Fernández-Trillo · Angeles Machín · Pilar de la Peña · Pedro Domínguez

Received: 23 February 2012 / Accepted: 25 February 2012 / Published online: 14 March 2012
© Springer-Verlag 2012

Abstract While the thyrotropin-releasing hormone (TRH) effect of raising intracellular Ca^{2+} levels has been shown to rely on $G_{q/11}$ and PLC activation, the molecular mechanisms involved in the regulation of ERG K^+ channels by TRH are still partially unknown. We have analysed the effects of $\beta\gamma$ scavengers, Akt/PKB inactivation, and TRH receptor (TRH-R) overexpression on such regulation in native and heterologous expression cell systems. In native rat pituitary GH_3 cells β-ARK/CT, $G\alpha_t$, and phosducin significantly reduced TRH inhibition of rERG currents, whereas in HEK-H36/T1 cells permanently expressing TRH-R and hERG, neither of the $\beta\gamma$ scavengers affected the TRH-induced shift in $V_{1/2}$. Use of specific siRNAs to knock Akt/PKB expression down abolished the TRH effect on HEK-H36/T1 cell hERG, but not on rERG from GH_3 cells. Indeed, wortmannin or long insulin pretreatment also blocked TRH regulation of ERG currents in HEK-H36/T1 but not in GH_3 cells. To determine whether these differences could be related to the amount of TRH-Rs in the cell, we studied the TRH concentration dependence of the Ca^{2+} and ERG responses in GH_3 cells overexpressing the receptors. The data indicated that independent of the receptor number additional cellular factor(s) contribute differently to couple the TRH-R to hERG channel modulation in HEK-H36/T1 cells. We conclude that regulation of ERG currents by TRH and its receptor is transduced in GH_3 and HEK-H36/T1 cell systems through common and different elements, and hence that the cell type influences the signalling pathways involved in the TRH-evoked responses.

Keywords ERG potassium channels · Signal transduction · Cell type dependence · G-protein · Protein kinase B · Thyrotropin-releasing hormone

Introduction

The human ERG (hERG) K^+ channel has been recognized as an important determinant of action potential characteristics in heart muscle and its inhibition by inherited mutations or many cardiac-related and non-cardiac-related prescribed drugs has been associated with an increased risk of cardiac arrhythmia and sudden death [16, 30]. Furthermore, ERG channels also seem to play a key role setting the electrical behaviour of other cell types including neurones and pituitary, glial, chromaffin, pancreatic β, and tumour cells [1, 55]. Interestingly, the observation that arrhythmogenic syncopes are usually associated with physical, emotional or auditory stress, suggests a link between hormonal (e.g. adrenergic) stimulation and cardiac ion channel function including hERG [53]. For that reason, many research groups have focussed on hormonal control of the channel, and the regulatory pathways used by such agents have been studied using both native and heterologous systems. While some pathways involved in control of hERG by different hormones have been elucidated, the molecular mechanisms of hERG regulation by different physiological agents remain unclear.

In native lactotrophs and clonal GH adenohypophysial cells, endogenous ERG currents are inhibited by activation of the G-protein and phospholipase C (PLC)-coupled

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00424-012-1094-y) contains supplementary material, which is available to authorized users.

L. Carretero · F. Barros · P. Miranda · J. Fernández-Trillo · A. Machín · P. de la Peña · P. Domínguez (✉)
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Edificio Santiago Gascón, Campus del Cristo, Universidad de Oviedo, 33006, Oviedo, Spain
e-mail: pdluengo@uniovi.es

thyrotropin-releasing hormone receptor (TRH-R) [3, 4, 8, 9, 47, 48]. The TRH-R is coupled to a G-protein of the $G_{q/11}$ family for activation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis leading to a "classical" Ca^{2+} and diacylglycerol/protein kinase C cascade (reviewed in [22]). However, TRH-induced inhibition of ERG currents in pituitary cells does not depend on protein kinase C or protein kinase A activation [3, 4, 8, 9, 47, 48] and a pathway for ERG regulation by TRH involving G_s and/or G_{13} has been recognized by our group in GH_3 cells [40]. Our initial results also showed a significant attenuation of the TRH-induced inhibition in cells overexpressing the α subunit of transducin ($G\alpha_t$; [40]), an agent known to sequester free $\beta\gamma$ complexes released from G-proteins [43].

Heterologous expression in *Xenopus* oocytes and mammalian cells, such as CHO and HEK293 cells, is extensively used to better understand the electrophysiological properties of ion channels, but also the signalling pathways involved in its hormonal modulation. Specifically, HEK293 cells permanently expressing hERG channels and hormone receptors have been used as a simple and defined model system to better define these parameters in the case of hERG [40, 58, 60], and it has been reported that basal activity of Akt/protein kinase B [13, 21, 24] is required for normal function of hERG channels stably expressed in these cells [58]. However, the possible participation of this kinase in hormonal regulation of ERG channels either in this heterologous expression system or in native GH_3 cells remains unknown. Interestingly, preliminary experiments in a HEK293 cell line (HEK-H36/T1) permanently expressing hERG channels and TRH-Rs suggested that some differences could exist between the G-protein coupling and the transduction cascades involved in the TRH-induced modulation of the native ERG currents in GH_3 cells and hERG in the heterologous expression system [40].

In this work, we have checked the possibility that the cell type could be affecting which elements are involved in the modulation of ERG currents. We have used scavengers of G-protein $\beta\gamma$ dimers and found that they impair the ability of TRH to modulate ERG currents in GH_3 but not in HEK-H36/T1 cells. We also blocked the activity of Akt/PKB kinase using siRNAs or pharmacological agents and found that whereas it is indeed necessary for the TRH-induced modulation of hERG in HEK-H36/T1 cells, it is not a requisite for the modulation of endogenous ERG currents in native GH_3 cells. Finally, we present results indicating that, although only a single population of TRH binding sites is present in both cell types, channel regulation shows different dependence on hormone concentration in GH_3 and HEK-H36/T1 cells not related to the level of receptor expression in the cells. All these data strongly support that the TRH pathway can lead to distinct downstream signalling patterns as a function of the cell type.

Materials and methods

Plasmids and chemicals

The original plasmid containing the cDNA for the HERG channel was a generous gift of Dr. E. Wanke (University of Milano, Italy). $G\alpha_t$ cDNA (provided by Dr. J.S. Gutkind, NIDCR, NIH, Bethesda) was cloned as an EcoRI/XhoI fragment in pcDNA3 (Invitrogen). Bovine phosducin cDNA was cloned as a Hind III fragment in pcDNA3.1/Hygro (Invitrogen). The carboxy-terminal segment of the β-adrenergic receptor kinase (β-ARK/CT or β-ARK1 (438-689) carboxyl-terminal minigene [34]) cloned en pREP4 (Invitrogen) was a gift of Dr. F. Mayor (CBM, CSIC, Madrid). TRH-R/YFP was prepared in our lab by cloning TRH-R cDNA [19] as a Hind III-Bam HI fragment in pEYFP-N1 (Clontech). Plasmid pEGFP-C1 (Clontech) was also used as a transfection reporter. Fura-2 and Fura-2/AM were from Molecular Probes, and TRH, insulin, nystatin, and RIPA buffer were from Sigma-Aldrich. E-4031 was from Alomone Labs. Specific siRNAs were ordered from Thermo-Fisher, and negative control siRNAs were ON-TARGETplus Non-targeting pool from Dharmacon. Anti-Akt antibodies were from Cell Signaling or from Santa Cruz, anti-β-actin was from Sigma, and anti-GAPDH from Santa Cruz. Anti-mouse and anti-rabbit secondary antibodies were either HRP-linked from Cell Signaling or fluorophore-linked from LI-COR Biosciences.

Cell culture and transfection

GH_3 rat anterior pituitary cells (ATCC-CCL 82.1) were grown in poly-L-lysine coated coverslips as previously detailed [23, 40, 41]. Generation and culture conditions of HEK-H36/T1 cells have been detailed elsewhere [40, 41]. Cells trypsinized 24 h prior to transfection were transiently transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Unless otherwise indicated, 5.0 μg of plasmids containing the different constructs and 0.5 μg of pEGFP-C1 coding for green fluorescent protein (EGFP) as a marker for transfection (ratio 10:1) were used. The mixture of 5.5 μg of total DNA and Lipofectamine 2000 was incubated in serum-free medium for 20 min and added to the plates containing the cells in serum-containing medium without antibiotics. Recordings were performed 48–72 h after transfection. Sometimes cells were plated in standard dishes without poly-L-lysine and used to measure Akt expression.

Electrophysiological recordings, solutions and data analysis

Current recordings were performed at room temperature with the perforated-patch variant of the patch-clamp technique using nystatin and as detailed elsewhere [2, 3, 5, 6, 23,

40, 41]. Electrode resistance amounted to 2–5 MΩ when filled with the pipette solution containing (in mM): 65 KCl, 30 K_2SO_4, 10 NaCl, 1 $MgCl_2$, 50 sucrose, and 10 HEPES (pH 7.4 with KOH). rERG current data are shown without correction for leakage and capacitive transients. A P/n method was used for leak and capacitive current subtraction of the hERG recordings in HEK-H36/T1 cells.

The standard extracellular saline used for perforation and monitoring $[Ca^{2+}]_i$ (see below) contained (in mM): 137 NaCl, 4 KCl, 1.8 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 10 glucose, and 10 HEPES (pH 7.4 with NaOH). Recordings of rERG currents in GH_3 cells were performed after changing the extracellular medium to high-K^+, Ca^{2+}-free solution once permeabilization of the patches had been completed [2, 3, 5, 6, 23, 40]. This solution contained (in mM): 140 KCl, 4 $MgCl_2$, 10 EGTA, and 10 HEPES titrated to pH 7.4 with KOH. In this case, inward currents were studied during hyperpolarization pulses to −100 mV from a holding potential of −10 mV. The magnitude of the inward currents was estimated as the total inward charge computed between cursors located at 0.5 and 100% duration of the hyperpolarization pulses [40]. hERG currents were recorded in HEK-H36/T1 cells in standard extracellular saline following the pulse protocols indicated in the figures. Kinetic parameters of activation and deactivation were obtained as previously described [7, 40, 41]. The voltage dependence of current activation was assessed using standard tail current analysis. Tail current magnitudes normalized to maximum were fitted with a Boltzmann function:

$$h(V) = I_{\max}\left[1/\left(1+\exp\left(\left(V-V_{1/2}\right)/k\right)\right)\right]$$

where V is the test potential, $V_{1/2}$ is the half-activation voltage, and k is the slope factor. The rates of deactivation in the HEK-H36/T1 cells were determined from negative-amplitude biexponential fits to the decaying phase of tail currents. Monoexponential fits to the decaying currents at −100 mV after subtracting the currents remaining in the presence of E-4031 were used in the case of the GH_3 cells. In all cases, the first cursor of the fitting window was advanced to the end of the initial hook due to the recovery of inactivation [40, 41].

Intracellular calcium measurements

Measurements of intracellular Ca^{2+} concentrations ($[Ca^{2+}]_i$) were performed in cells plated on poly-L-lysine-coated coverslips as indicated above. Procedures for cell loading with the Ca^{2+}-sensitive dye Fura-2 and $[Ca^{2+}]_i$ recordings have been detailed elsewhere [40]. Ca^{2+} concentrations were estimated from the ratio of the Fura-2 emission intensities for 340/380 nm excitations, after comparison with Fura-2 standards [5, 40]. In this case, YFP instead of GFP was used as a marker of transfection to prevent interference with the Fura-2 fluorescence.

RNA interference

Expression of Akt/PKB genes in HEK-H36/T1 or GH_3 cells was blocked by using siRNA mixtures prepared against human Akt1 (NM_001014432.1) or rat Akt1 (NM_0033230.1) sequences, prepared as follows. Total RNA from HEK-H36/T1 or GH_3 cells was retrotranscribed using a human (5′-AGCTGCAGAAGTCCTTAACATTTG) or rat (5′-GAGAAACAAAACCATCAGGTACAG) Akt1 primer. Then, human or rat Akt1 cDNAs were amplified by PCR using specific primers with a T7 promoter sequence (5′-CGCTAATACGACTCACTATAGGG) attached to their 5′ end. Human Akt1 cDNA was amplified from positions 1335 to 2105 (forward: 5′-T7-CCACCATGAAGACCTTTTGC; reverse: 5′-T7-ACACCCGGAGAACAAACTGG) and rat Akt1 cDNA was amplified from positions 359 to 1427 (forward: 5′-T7-TGGCTGATGGACTCAAACGG; reverse: 5′-T7-TCCACACACTCCATGCTGTC). After amplification, PCR products were purified, quantified, and sequenced. Next, human or rat Akt1 cDNA fragments were in vitro transcribed from the T7 promoter with MEGAscript® T7 High Yield Transcription Kit (Ambion), and the dsRNAs were purified and quantified. Finally, dsRNAs were treated with BLOCK-iT™ Dicer Enzyme (Invitrogen), and siRNAs mixtures purified from uncut dsRNA fragments using BLOCK-iT™ RNAi Purification Kits (Invitrogen), quantified, and checked for the correct size. In some experiments, specific siRNAs were used targeting rat Akt1 (1112: 5′-UGUUCGAGCUCAUCCUAAUTT) or human Akt1 (501: 5′-ACUUCCUCCUCAAGAAUGATT), which had been designed using available siRNA prediction programs and checked by a BLAST search to have no relevant sequence homology to other genes. HEK-H36/T1 and GH_3 cells were transfected with 0.5–1.0 μg of the corresponding siRNAs mix or 100 pmol of the specific siRNA, plus 1 μg of pEGFP-C1 plasmid, using 3 μl of Lipofectamine 2000 in 300 μl of serum-free medium. This mixture was incubated for 20 min and added to the 35 mm dishes containing the cells in serum-containing medium without antibiotics. Control cells were transfected with 1 μg of ON-TARGETplus Non-targeting pool (Dharmacon) containing a mix of four siRNAs non-targeting for human and rat genes. The amount of transfection reagent was selected to keep the cell membranes suitable for electrophysiological measurements.

Western blot analysis

The expression levels of Akt/PKB proteins were measured 48 h after transfection with the siRNAs. Due to their very low transfection efficiency, expression of Akt/PKB proteins in GH_3 cells was only measured in fluorescent cells (i.e. transfected with pEGFP-C1) after sorting them with a FACStar Plus Cell Sorter (Becton Dickinson), in order to better estimate the siRNAs effects. Cells were washed and

collected in PBS, resuspended in 100 μl of RIPA buffer and disrupted by sonication three times for 2 min followed by 1 min incubations on ice. After centrifugation of lysates at 16,000×*g* for 15 min at 4°C, the supernatants were recovered, and the concentration of protein was determined using the BCA™ Protein Assay Kit (Pierce). Samples were mixed with SDS-PAGE loading buffer, heated at 95°C for 5 min, and resolved in 8% or 10% SDS-PAGE gels. Then, proteins were transferred to PVDF Hybond-P membranes (Amersham-GE Healthcare) and blocked according to the antibodies manufacturer´s instructions. Signal was detected using either SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce) with Kodak X-Omat LS films, or the Odyssey (LI-COR Biosciences) infrared detection system.

Statistics

Data values given in the text and in figures with error bars represent mean±S.E.M. for the number of indicated cells. Comparison between data groups was at first performed by parametric Student's unpaired *t* test (2-tailed) or ANOVA. Due to dispersion of the data in individual cells after some treatments, non-homogeneous variances (as evidenced after a Bartlett's test) were sometimes obtained. Therefore, alternate Welch *t* test assuming Gaussian populations with unequal SD's was used. In all cases, p values <0.05 were considered as indicative of statistical significance. When indicated, n represents the number of tested cells and N the number of transfections.

Results

Effect of G-protein βγ scavengers on TRH-induced modulation of ERG channels

Previous work from our laboratory indicated that introduction in GH_3 adenohypophysial cells of $G\alpha_t$, able to act as a scavenger of βγ dimers released from G-proteins by receptor stimulation, significantly attenuated rERG inhibition by TRH. However, the presence of $G\alpha_t$ did not appear to alter the TRH-induced shifts in hERG activation voltage dependence in HEK-H36/T1 cells, a permanently transfected HEK-293 cell line showing high hERG current densities and consistent hormonal responses following activation of the TRH-Rs also introduced in the cells [40]. As an initial step to confirm the existence of differences in the transduction cascade coupling the TRH-R to ERG channels regulation as a function of the cell type, we compared the TRH effects on ERG currents in the presence and the absence of the COOH-terminal part of β-adrenergic receptor kinase (βARK/CT), an agent able to effectively bind and sequester free βγ complexes when dissociated from Gα subunits upon receptor stimulation [34]. Only cells identified by fluorescence of EGFP used as a reporter of transfection were selected for recording. We also used perforated-patch conditions to minimize cell dialysis and to preserve intact the intracellular components necessary for the hormonal response.

Thus, we first quantified the strong and reproducible rERG current reductions triggered by TRH in GH_3 cells measuring the total inward charge elicited during the hyperpolarizing pulses (see the "Materials and methods" section and [40] for details). Due to the strong TRH-induced diminution of the current magnitude and the need to perform a subtractive method for isolation of the endogenous rERG current (see below), we found technically unsuitable to perform a direct and accurate comparison of the current activation voltage dependence in the presence and the absence of the hormone, particularly in cells previously subjected to transfection. However, it has previously been shown that the charge reductions are due to a rightward shift in activation voltage dependence combined with a relatively small reduction of maximal current density at positive potentials [33]. In this case, isolation of the endogenous rERG current present in GH_3 cells and quantification of its TRH-induced inhibition was performed in high-K^+ low-Ca^{2+} extracellular solutions using hyperpolarization pulses to −100 mV from a depolarized holding potential of −10/−20 mV. As previously reported, these conditions would increase the otherwise inwardly rectifying ERG currents, reducing the Ca^{2+} currents and the subsequent activation of the Ca^{2+}-dependent K^+ currents also present in these cells [3, 6, 8]. Furthermore, 5 μM of the ERG-specific blocker E-4031 was added at the end of each experiment to totally block the rERG currents and to subtract the E-4031-insensitive current, allowing quantification of the TRH effects exclusively on the rERG currents in every individual cell [23, 40, 56]. This subtractive method allowed for comparison of the TRH effects on the rERG current of GH_3 cells transfected with or without βγ dimer scavengers (Fig. 1). It can be observed that, analogous to the results observed with $G\alpha_t$ (Fig. 1 and [40]), the inhibition of rERG by TRH was attenuated from 76.8±3.5% (n=4) in control cells to 35.5±7.2% (n=6) in the presence of βARK/CT (p<0.005). As final confirmation that free βγ dimers are indeed necessary for the TRH effects in GH_3 cells, we also used phosducin, another agent known to bind free βγ dimers with high affinity, blocking their action [12]. In this case, the TRH-induced inhibition of the GH_3 rERG was reduced to 37.2±3.6% (n=6, p<0.001) in GH_3 cells overexpressing phosducin (Fig. 1). Interestingly, the impairment of the TRH-induced inhibition of the currents caused by the βγ dimer scavengers was not paralleled by a similar antagonization of the accelerations in deactivation kinetics promoted by the hormone at −100 mV. Thus, whereas in control cells the 230

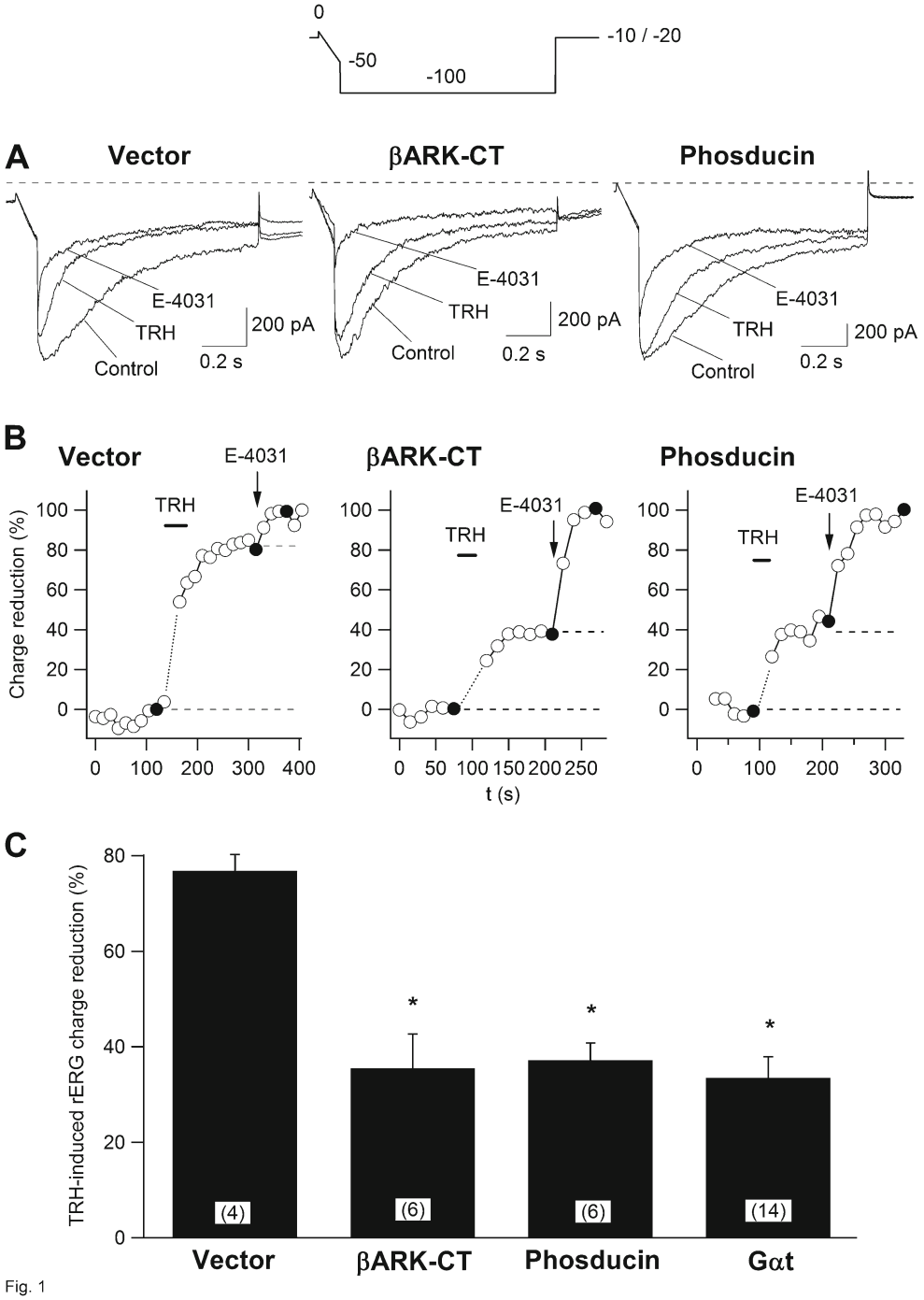


Fig. 1

Fig. 1 G protein βγ dimer scavengers decrease TRH-induced inhibition of endogenous rERG currents in GH_3 cells. **a** Effect of TRH on rERG currents. Representative current traces are shown for three cells 48 h after transfection with vector pcDNA.3 or with plasmids encoding the βγ scavengers β-ARK/CT and phosducin. Currents were elicited in response to the voltage protocol shown at the *top*. The hyperpolarization step was preceded by a 100-ms ramp from 0 to −50 mV [23]. *Superimposed traces* correspond to those obtained before (*Control*) and after addition of 1 μM TRH and 5 μM E-4031. For more details, see text. **b** Time course of the TRH and E-4031 effects. Current estimations were performed in the same cells as in panel **a** from total inward charge during the hyperpolarization steps at −100 mV as described in the "Materials and methods" section. Averaged charge values before any addition and after adding 5 μM E-4031 were considered as 0% and 100%, respectively. *Filled circles* correspond to the current traces shown in **a**. The first or first and second data points after starting the TRH addition, when total inward currents become transiently enhanced by activation of Ca^{2+}-dependent K^+ channels due to massive liberation of Ca^{2+} from intracellular stores, have been deleted for clarity. Duration of TRH perfusion and addition of E-4031 to the recording chamber are indicated with a thick line and an arrow, respectively. Current levels in the absence and presence of TRH are indicated by *horizontal dashed lines*. The *Y*-axis label on the left applies to the three panels. **c** Averaged percentages of rERG current inhibition induced by TRH in GH_3 cells transfected with βγ scavengers. Data corresponding to β-ARK/CT, phosducin, and $G\alpha_t$ are shown and compared with those from cells transfected with pcDNA.3. Current inhibitions were estimated from total inward charge as described in **b**. *$p<0.05$ vs. control vector

±23 ms deactivation time constant was reduced by TRH to 123±10 ms (n=4; p<0.01), these values amounted 234±16 and 156±15 ms (n=6; p<0.01) in cells transfected with βARK/CT. Furthermore, in cells expressing phosducin, the deactivation time constants corresponded to 292±37 and 164±30 ms (n=6; p<0.02) in the absence and the presence of TRH, respectively.

It is important to note that, as reported for $G\alpha_t$ [40], the inhibitory effects of β-ARK/CT and phosducin are specific for the TRH-induced reduction of the rERG currents, because the elevations in $[Ca^{2+}]_i$ triggered by the hormone remained unaltered in the cells transfected with the βγ dimer scavengers (Suppl. Fig. 1). Thus, the addition of 1 μM TRH to control cells only expressing the transfection marker EGFP elicited an initial peak of $[Ca^{2+}]_i$ elevation that raised the cation from a basal averaged level of 124±2 nM up to 253±44 nM (n=13). These values amounted to 120±20 and 221±20 nM, respectively, in the β-ARK/CT-transfected cells (n=13). Finally, the basal 115±1 nM $[Ca^{2+}]_i$ was raised to an initial peak of 257±20 nM (n=18) after adding TRH to the GH_3 cells transfected with phosducin. Interestingly, these hormone-induced $[Ca^{2+}]_i$ increases were almost the same than those observed in the cells from the same plates in which the presence of the transfection marker was not detected (YFP—in supplementary Fig. 1).

To confirm the presence of differences in the TRH-induced effects related to cell type, we performed experiments with human HEK-H36/T1 cells similar to those in rat adenohypophysial GH_3 cells, measuring the rightward shift in hERG activation voltage dependence triggered by the hormone in the EGFP fluorescent cells. It has been repeatedly demonstrated that the native ERG current of GH_3 cells is almost undetectable using external solutions with physiological levels of K^+, and that careful formulation of the high-KCl recording medium and the recording protocols is necessary for native ERG isolation from other endogenous currents [3, 6, 8, 23, 33, 40, 47, 48, 56]. However, our attempts to extrapolate such conditions to hERG recordings using HEK-H36/T1 cells were hampered by the systematic appearance of huge E-4031-insensitive currents when the extracellular K^+ concentration was increased (e.g. to 40 or 140 mM both plus and minus EGTA). Therefore, the standard extracellular saline with low mM levels of K^+ and Ca^{2+} was used for recordings in these cells. As shown in Fig. 2, addition of TRH to cells transfected with a control pcDNA3 vector (without any βγ scavenger) induced a rightward shift of the hERG I/V curve that amounted to 21.3±1.1 mV (n=8). This shift remained the same in the β-ARK/CT-transfected cells (21.8±2.0 mV, n=7). As stated in the legend of Fig. 2, the steepness of the activation curves was not significantly modified by the hormone either in the absence or the presence of the scavenger. It is interesting to note that the presence of the βγ scavenger did not also impair the ability of the hormone to accelerate tail currents decay. Fitting a bi-exponential function to the decaying tail current phase at −50 mV yielded fast and slow deactivation time constants of 138±11 and 973±114 ms (n=7) in the β-ARK/CT-transfected cells before TRH addition. These values were reduced by the hormone to 94±11 and 627±65 ms (p<0.05), respectively. This behaviour paralleled that observed in control cells without β-ARK/CT, showing fast and slow deactivation time constants of 136±13 and 775±46 ms (n=5), that were reduced by TRH to 85±6 and 460±30 ms (p<0.01).

It seems unlikely that failure to modify these TRH-induced effects was due to lack of efficient expression of β-ARK/CT in these cells, since they showed much higher transfection efficiencies than those exhibited in the pituitary cells, in which the scavenger clearly reduced the hormone effects (see above). This interpretation is further supported by the data obtained with phosducin. In this case the activation voltage dependence shift amounted to 20.2±2.2 mV (n=4), a value again similar to that observed in the control cells (Fig. 2). Besides confirming the results previously obtained with $G\alpha_t$ (Fig. 2 and [40]) and β-ARK/CT, these data indicate that free βγ dimers are not involved in the TRH-induced modulation of hERG kinetics in the HEK-H36/T1 cells. Therefore, our results suggest that some cellular components involved in hormone action may vary as a function of the cell type in which they are taking place.

Effect of Akt/PKB-directed siRNAs on enzyme protein levels and TRH-induced modulation of ERG currents

It has been previously reported that basal activity of Akt/protein kinase B (PKB) is required for normal function of hERG channels stably expressed in HEK293 cells [58]. Since an unknown kinase(s) activity has long been implicated in the transduction pathway from TRH-R to ERG channels [23], we studied the implication of Akt/PKB in this pathway performing experiments with siRNAs developed against the kinase.

To check whether the hormonal modulation of the rERG channels in GH_3 cells was dependent on the presence of Akt/PKB, we initially generated an siRNA mixture designed to block the expression of the rat Akt/PKB genes from these cells, using the rat Akt1 mRNA stretch between positions 359 and 1427 as target. Note that this siRNA mixture is expected to interfere not only with the expression of rat Akt1, but also Akt2 and Akt3 genes, since they show identities of 79% and 71% to rat Akt1, respectively. As a negative control we used a pool of non-targeting siRNAs and as a positive control a mixture of siRNAs against the α subunit of the G_q protein. Whereas the anti-$G\alpha_q$ was very effective at minimizing the G_q-dependent and IP_3-dependent initial $[Ca^{2+}]_i$ elevations triggered by TRH in the GH_3 cells

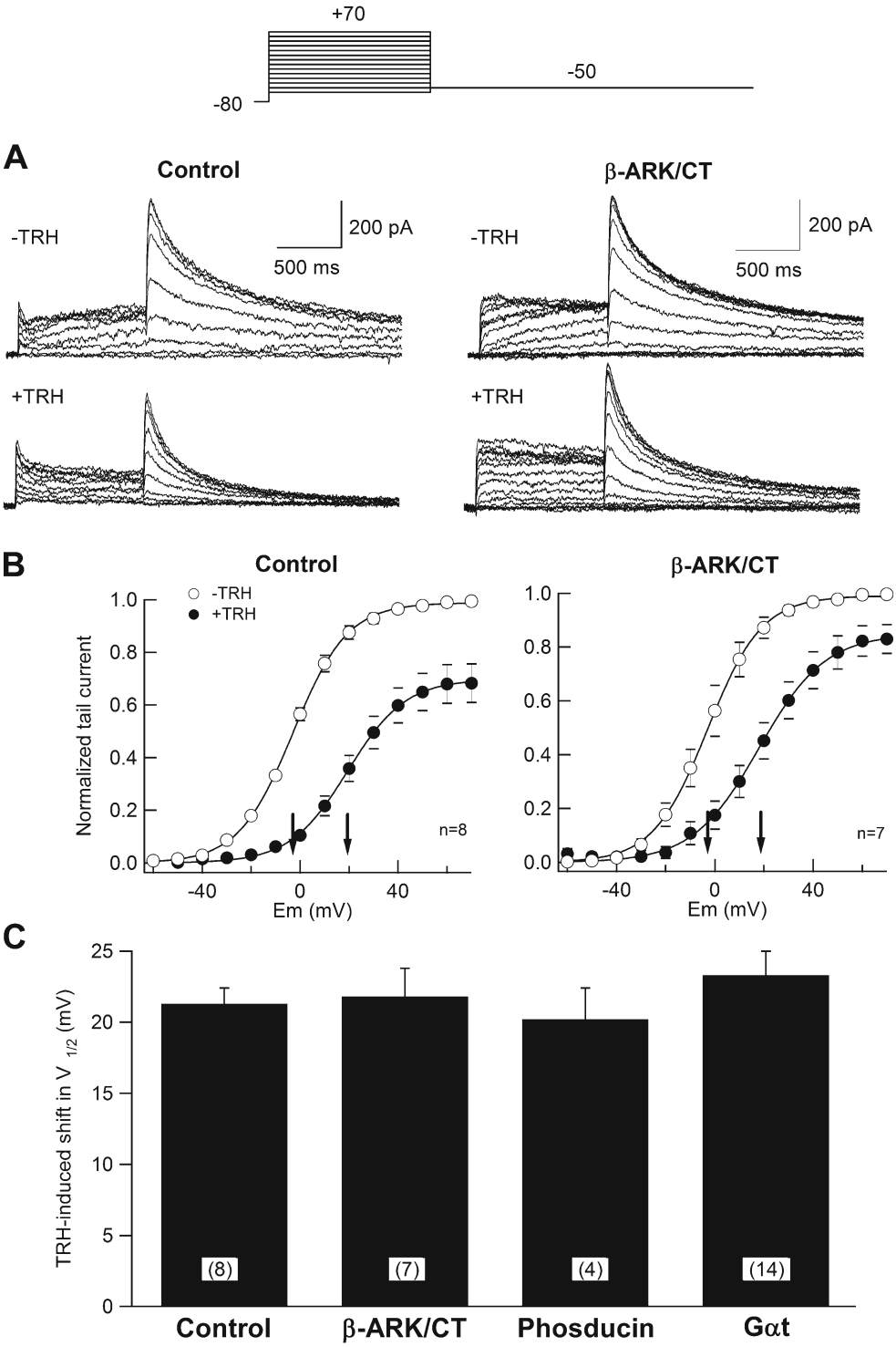


Fig. 2 TRH-induced hERG modulation is not altered by βγ scavengers in HEK-H36/T1 cells. **a** Representative current traces in response to the voltage protocol depicted at the *top* are shown for two cells transfected with pcDNA.3 vector alone (*Control*) or with β-ARK/CT. Currents correspond to those recorded before (−TRH) and 2 min after adding 1 μM TRH (+TRH). Note that the tail currents during the repolarization step to −50 mV almost exclusively correspond to those mediated by hERG channels, since they are largely abolished in the presence of E-4031 [40]. **b** Effect of β-ARK/CT on TRH-induced modifications of hERG activation voltage dependence. Averaged I/V curves normalized to maximum before TRH addition are shown for the number of indicated cells. $V_{1/2}$ values before and after adding TRH are indicated with *arrows* in the graphs. Similar steepness of the activation curves was observed upon TRH addition. Thus, the slope factor amounted 12.1±1.1 and 11.3±0.9 (n=8) with and without TRH in the control cells, and 12.1±0.6 and 10.4±0.6 (n=7) in the cells transfected with β-ARK/CT. The *Y*-axis label on the *left* applies to both panels. **c** Comparison of TRH-induced shifts in hERG activation voltage dependence in the presence of βγ dimer scavengers

(not shown), the inhibitions of the rERG currents induced by the hormone in these cells remained almost the same in the presence of up to 1 μg of the siRNA mixture against Akt (Fig. 3). To confirm that this amount of silencing agent was effective at knocking Akt/PKB expression down, we estimated the protein levels by Western analysis. As for electrophysiological analysis, only successfully transfected cells, identified by their EGFP fluorescence and selected from the rest by a cell sorter, were used. This allowed us to detect a prominent reduction of the protein levels of the three rat Akt/PKB isoforms (Akt1 of 55.7 kDa, Akt2 of 55.5 kDa, and Akt3 of 55.8 kDa) in the presence of the anti-Akt/PKB siRNAs, close to 75% in cells transfected with 1 μg of the siRNAs mixture (Fig. 3a). As confirmation that Akt/PKB expression is not involved in the hormonal inhibition of rERG in the GH_3 cells, we also used a specific

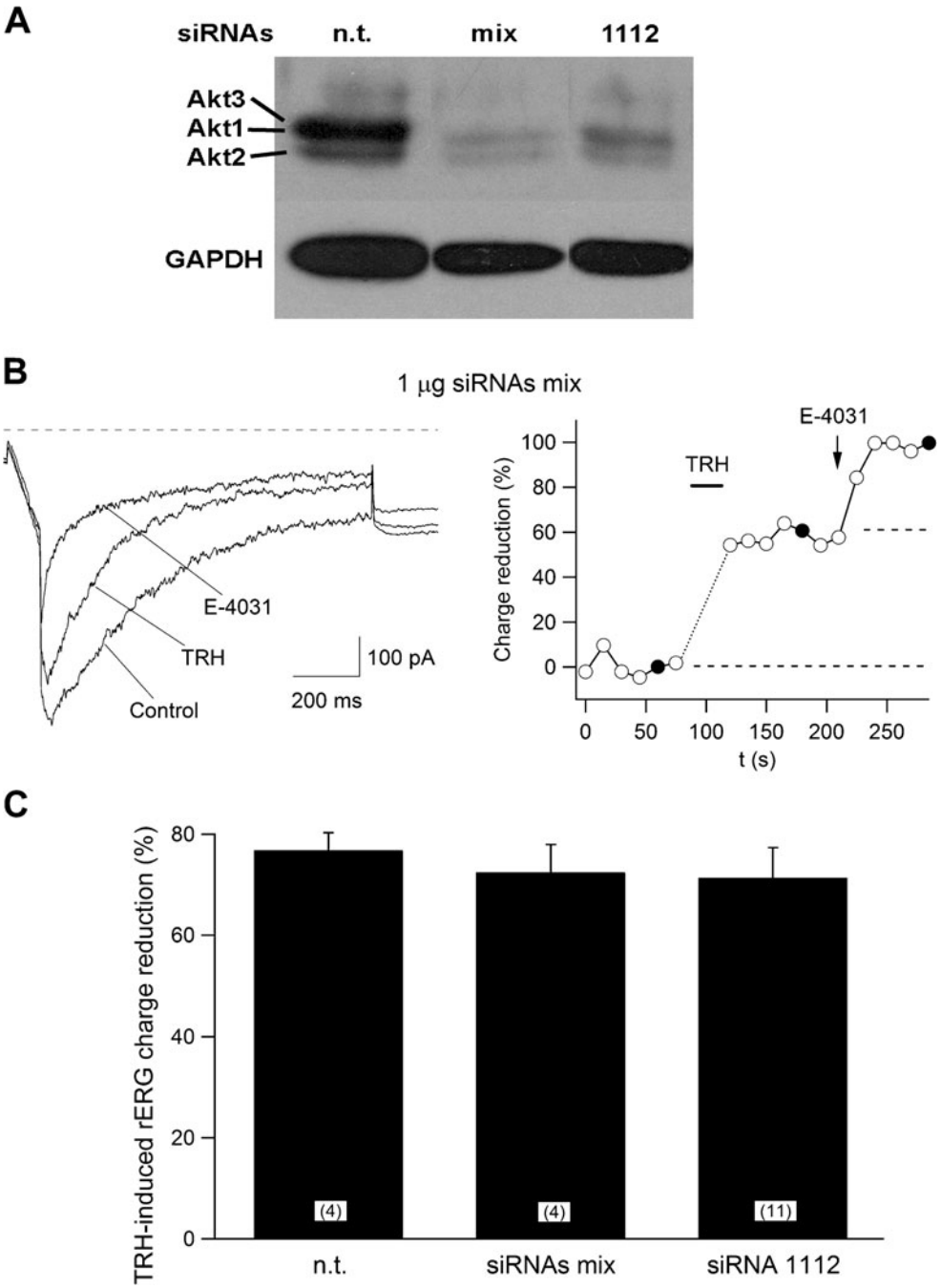


Fig. 3 Knockdown of Akt/PKB does not interfere with rERG regulation by TRH in GH_3 cells. **a** Blockade of Akt/PKB expression by siRNAs in EGFP positive GH_3 cells. Cells were transfected with 1 μg of non-targeting (*n.t.*) siRNAs, 1 μg of anti-rat Akt1 siRNAs mix, or 1 μg of anti-rat Akt1 siRNA 112, plus 1 μg of pEGFP-C1 in each case, and after 48 h selected with a FACStar Plus Cell Sorter. Cell extracts were separated by 10% SDS-PAGE and subjected to immunodetection with anti-Akt and anti-GAPDH antibodies. **b** Effect of TRH on GH_3 cell rERG currents in the presence of anti-Akt siRNAs. Representative current traces from one cell transfected with 1 μg of anti-Akt siRNA mix are shown on the *left*. Currents were recorded as indicated in Fig. 1 before and after addition of 1 μM TRH and 5 μM E-4031. Monoexponential fits to the decaying phase of the currents at −100 mV after subtracting the current remaining in the presence of E-4031, yielded deactivation constants of 258 and 150 ms before and after adding TRH, respectively. The time course of the TRH and E-4031 effects in the same cell is shown on the *right*. *Filled circles* correspond to the current traces shown on the *right*. **c** Averaged percentage of rERG current inhibition induced by TRH in GH_3 cells transfected with 1 μg of non-targeting siRNAs, anti-rat Akt siRNA mix, or anti-rat Akt1 specific 1112 siRNA

siRNA (named 1112) directed against the sequence of rat Akt1. In this case, equivalent results to those obtained with the siRNA mix were observed, since although similar reductions in the level of Akt expression were elicited in cells transfected with 1 μg of 1112 siRNA, an averaged rERG current inhibition of 71.36±6% (n=11) was induced by TRH in the cells treated with this amount of the silencing agent (Fig. 3)

To check for possible differences as a function of the cell type, we also studied the implication of Akt/PKB in the response to TRH in HEK-H36/T1 cells. We therefore prepared an siRNA mix against human Akt1 mRNA (from positions 1339 to 2105), intended to block the expression of the Akt/PKB genes in HEK-H36/T1 cells, and the knockdown of Akt/PKB expression was assessed by western blot (Fig. 4). As shown in Fig. 4a, a reduction of the three Akt/PKB isoforms described in human cells (Akt1 of 65 kDa, Akt2 of 60 kDa, and Akt3 of 58 kDa) is clearly induced by the siRNAs mixture that produced a marked decrease in protein levels when transfecting with 500 ng of siRNAs. Despite the fact that the mix was directed against Akt1, the decrease is also observed in the Akt2/Akt3 bands, which could be due to the fact that Akt2 and Akt3 show 80% and 72% identity to Akt1, respectively.

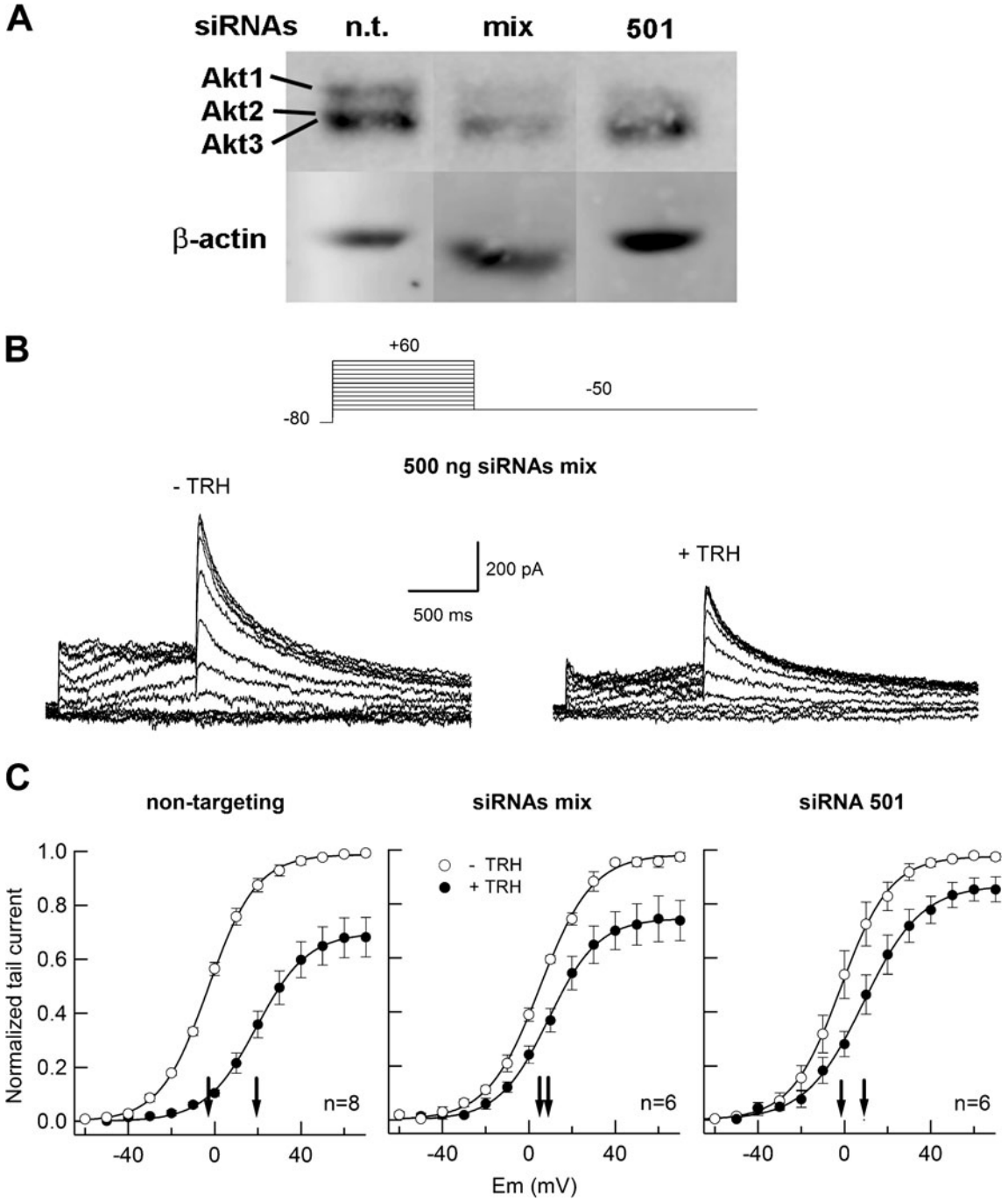


Fig. 4 Knockdown of Akt/PKB blocks hERG regulation by TRH in HEK-H36/T1 cells. **a** Blockade of Akt/PKB expression by siRNAs in HEK-H36/T1 cells. Cells were transfected with 1 μg of non-targeting (*n.t.*) siRNAs, 0.5 μg of anti-human Akt siRNA mix or 1 μg of anti-human Akt1 siRNA 501. Cell extracts were separated by 8% SDS-PAGE and subjected to immunodetection with anti-Akt and anti-β-actin antibodies. **b** Effect of TRH on hERG currents in the presence of anti-Akt siRNAs. Representative currents from one cell transfected with 500 ng of siRNA mix (*left*) or 1 mg of siRNA 501 (*right*), before (−TRH) and after (+TRH) adding 1 μM TRH. The voltage protocol used to elicit the currents is shown at the *top*. **c** Effect of anti-Akt siRNAs on TRH-induced modifications of hERG activation voltage dependence. Averaged I/V curves normalized to maximum before TRH addition are shown for cells transfected with siRNAs non-targeting (1 μg), anti-Akt mix (0.5 μg), or 501 (1 μg). The slope factors of the curves in the cells transfected with the siRNAs mix amounted 12.0±0.9 and 11.5±0.9 (n=6) without and with TRH, respectively. These values corresponded to 11.2±0.3 and 12.4±0.5 (n=6) in the siRNA 501-containing cells. The *Y*-axis label on the *left* applies to the three panels

The efficacy of the siRNA mixture in suppressing Akt/PKB expression in HEK-H36/T1 cells prompted us to check the effects of TRH-R stimulation on hERG currents in the siRNA-transfected cells. Again, only successfully

transfected cells identified by their EGFP fluorescence were selected for recording. As shown in Fig. 4b, c, the shift to more positive voltages caused by TRH in the hERG I/V curve when siRNAs had not been added to the cells (21.3 mV, see above), was drastically reduced both in cells transfected with 500 ng of the anti-Akt1 siRNA mixtures (shift value 3.5±1.9 mV, n=6; p<0.01). The introduction of the silencing agent also impaired the ability of the hormone to accelerate tail current deactivation. Thus, the fast and slow deactivation time constants in the untransfected cells were 136±13 and 775±46 ms (n=5) before and 85±6 and 460±30 ms (p<0.01) after TRH treatment. On the other hand, whereas in the cells transfected with 500 ng of siRNA the constants amounted to 152±28 and 824±43 ms (n=3) without TRH treatment, no significant alterations of these values were observed upon hormone addition to the cells, that showed values of 132±13 and 727±73 ms. Interestingly, the antagonization of the TRH effect by anti-PKB siRNAs was less marked on the relatively small current reductions induced by the hormone in these cells, since maximal peak tail currents were lowered by TRH 36.2± 4.4% (n=8) in non-transfected cells, whereas TRH addition produced 24.6±4.0% (n=6, p=0.08) smaller peak tail currents in cells transfected with 500 ng of siRNA. To confirm that the effect of the siRNA mix was indeed due to the knockdown of Akt/PKB expression and not to an off-target action on other gene(s) due to the multitude of different siRNAs present in the mix, we designed and used the siRNA 501, specific for the sequence of human Akt1 mRNA. Cells transfected with 1 μg of this siRNA showed an effective and specific block of Akt1 expression (Fig. 4a), and also an impaired response to TRH, since the hERG current shift in activation voltage dependence was reduced to 10.4±1.9 mV (n=6, p<0.05; Fig. 4c).

It is important to note that, as expected, the influence of the interference agent impairing the TRH effect is exerted in a component of the signalling cascade distal to the receptor itself, since the TRH-R coupling to $G_{q/11}$ leading to elevations of intracellular Ca^{2+} upon TRH addition [40] remained unaltered in the presence of anti-Akt siRNA. Thus, the initial peak of $[Ca^{2+}]_i$ elevation induced by TRH in untransfected Fura-2-loaded HEK-H36/T1 cells increased the cation levels from 39 ±1 to 198±3 nM (n=35, N=2). Almost identical results were obtained in the siRNA-transfected cells: the $[Ca^{2+}]_i$ increased from 39±2 to 183±6 nM (n=39, N=3) in cells in which fluorescence of the transfection marker EGFP was detected, and from 35±2 to 173±11 nM (n=11, N=3) in the cell subpopulations in which EGFP fluorescence was negligible.

The fact that Akt/PKB presence is essential for the transduction of the TRH signal in HEK-H36/T1 but not in GH_3 cells emphasizes again the influence of the cell type on the molecular mechanisms used by the hormone to modulate ERG channel functionality.

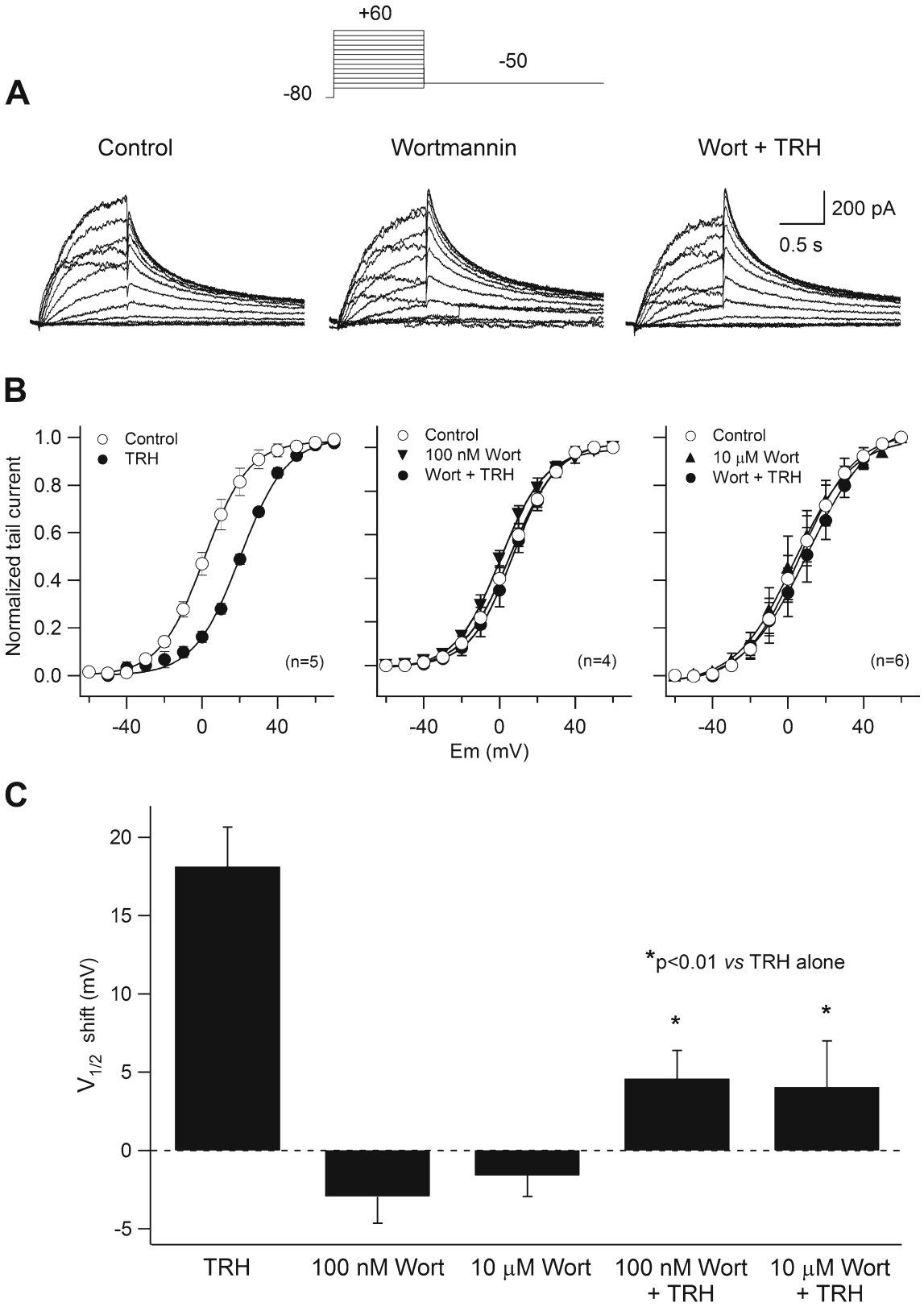
Cell-dependent effect of pharmacological blockade of Akt/PKB activation on TRH-induced ERG modulation

The results presented above strongly suggest that Akt/PKB is involved in TRH modulation of hERG currents in HEK-H36/T1 cells. Even though potent and specific inhibitors of Akt/PKB are not available, the participation of PI3K in the signalling cascade linking different stimuli to Akt/PKB activation has been firmly established [13, 24, 26]. Therefore, we used wortmannin to inhibit PI3K activation and thereby the downstream PI3K-dependent Akt/PKB activation in HEK-H36/T1 cells. The effects of the inhibitor were assessed following a 5-min incubation of the patch-perforated cells prior to TRH addition. The results in Fig. 5 show that in the presence of 100 nM wortmannin the TRH-induced shift in the hERG I/V curves is strongly reduced [from 21.3 mV in controls to 4.6± 1.8 mV (n=4) with wortmannin; p<0.01]. Almost identical results were obtained increasing the wortmannin level to 10 μM, a concentration at which not only PI3K, but also PIP_2 resynthesis by phosphatidylinositol 4-kinase is impaired [42]. These results contrast with our previous data demonstrating that treatment of GH_3 cells with up to 10 μM wortmannin does not modify the TRH-induced inhibition of the endogenous rERG currents [23]. They also indicate that, unlike the results obtained in the HEK-H36/T1 cells heterologous expression system, Akt/PKB activity is not necessary for TRH effects in native GH_3 cells. Finally, they further suggest that the cell specific protein composition/availability can indeed modulate which elements in the signal transduction pathways are involved in the TRH response.

Hormonal activators of Akt/PKB impair the ability of TRH to modulate ERG channels in a cell-dependent way

As additional confirmation that the influence of wortmannin and siRNAs blocking the TRH effect on ERG in HEK-H36/T1 but not in GH_3 cells is due to impairment of Akt/PKB action, we studied the TRH-induced shifts in hERG activation voltage dependence following treatment of the cells with insulin, a potent and very well-known physiological

Fig. 5 Abolishment of TRH-induced modulation of in HEK-H36/T1 hERG channel modulation by wortmannin. **a** Representative currents in response to the voltage protocol shown at the *top* before (*Control*), 5 min after treatment with 100 nM wortmannin (*wortmannin*), and in the presence of wortmannin plus 1 μM TRH (*wort + TRH*). **b** Elimination of the TRH-induced modulation of hERG activation voltage dependence in the presence of low (100 nM) and high (10 μM) concentrations of wortmannin. The *Y*-axis label on the *left* applies to the three panels. **c** Quantification of the wortmannin and wortmannin plus TRH effects on hERG activation voltage dependence. Note the small but not significant *left shift* in the I/V curves induced by wortmannin, and also that the shift values in the presence of TRH plus wortmannin refer to the displacement of the curves respect to those elicited in the presence of the inhibitor alone



activator of the PI3K-Akt signalling cascade in a variety of cells [13, 21, 29]. In these experiments, 1 μM insulin was used to ensure proper and complete activation of Akt/PKB through either the insulin receptor or the IGF-1 receptor that have been co-localized in HEK293 cells [11, 35]. In HEK-H36/T1 cells, the $V_{1/2}$ value of the isochronal I/V curves for

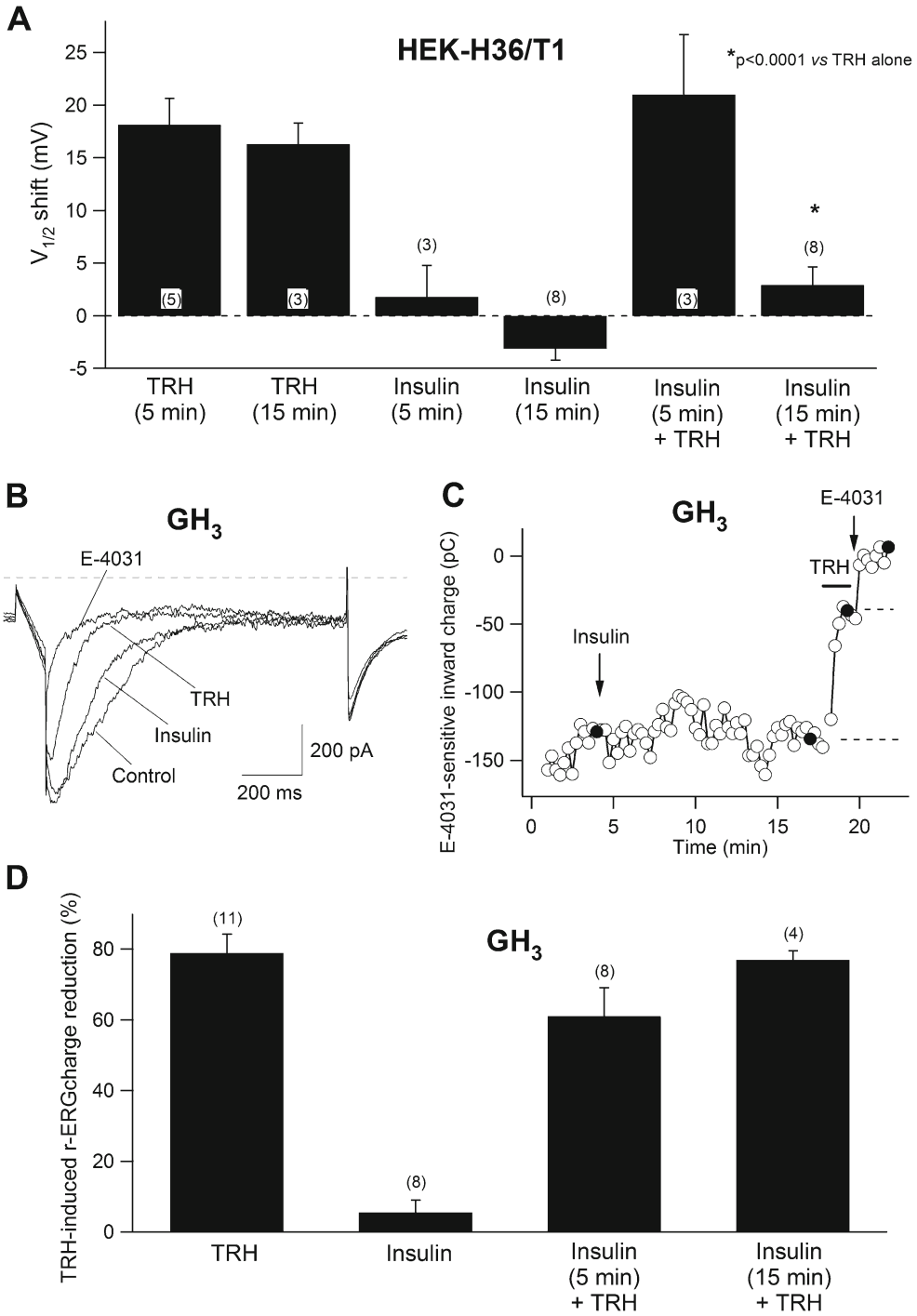


Fig. 6 Cell-selective blockade of TRH-induced regulation of ERG currents by long-term treatment with insulin. **a** Quantification of insulin and TRH effects on activation voltage dependence shifts of HEK-H36/T1 cell hERG currents. Note that the shift values in the presence of TRH plus insulin refer to the rightward displacement of the curves respect to those elicited in the presence of insulin alone. **b** Effect of insulin and insulin plus TRH treatment on GH_3 cell rERG currents. **c** Time course of insulin and TRH effects on GH_3 cell rERG currents. *Filled circles* correspond to the current traces shown in panel **b**. Values of total inward charge (see the "Materials and methods" section) respect to that measured in the presence of E-4031 are represented vs time. **d** Quantification of the insulin effect on TRH-induced inhibition of GH_3 cell rERG currents

hERG activation remained unaltered following exposure to insulin for 5 or 15 min (Fig. 6a). However, whereas a normal rightward shift in activation voltage dependence was still observed when adding TRH after a 5-min insulin treatment (averaged shift value 21.0±5.7 mV, n=3, p=0.93), the TRH-induced displacement of the I/V curves was nearly abolished in cells exposed to insulin for a longer period of 15 min (2.9±1.7 mV shift, n=8, p<0.0001).

As shown in Fig. 6b–d, the reduction of the E-4031-sensitive current induced by TRH in GH_3 cells (78.9±5.4%, n=11) was not significantly altered when they were previously incubated with 1 μM insulin for 5 min (61.0±8.1%, n=8; p=0.07), even though maximum Akt/PKB activation in response to insulin has been observed in these cells under similar conditions [27]. Increasing the insulin treatment up to 15 min did not change the ability of TRH to inhibit rERG (77.0±2.6% inhibition, n=4; p=0.84). Almost identical results pertaining to insulin effects and TRH treatments were obtained using GH_4C_1 cells (data not shown), a cloned variant of the GH_3 cells in which activation of the

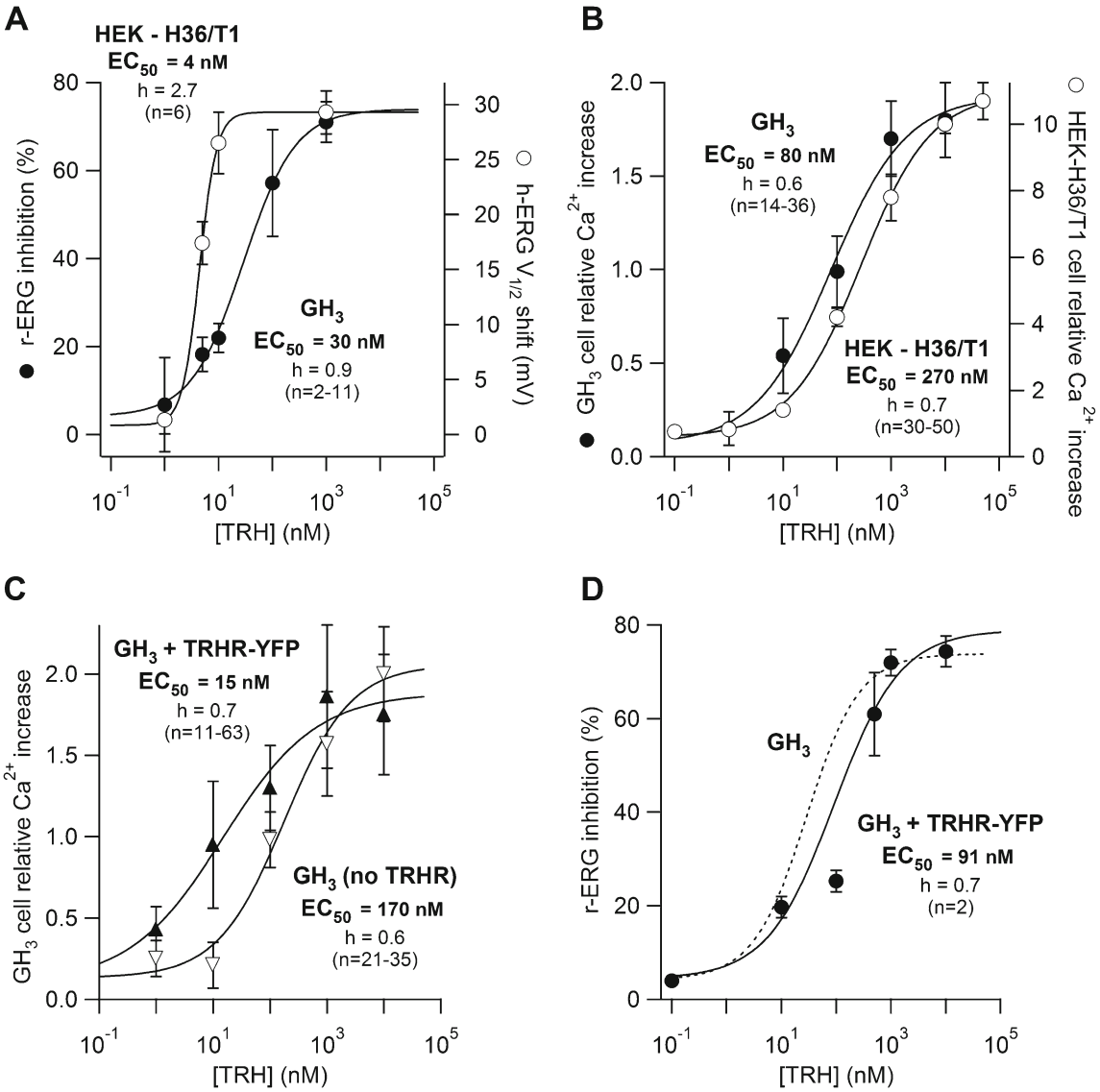


Fig. 7 Concentration dependence of TRH effects in HEK-H36/T1 cells and in GH_3 cells with and without overexpressed TRH-Rs. **a** Dose–response curves for TRH-induced modulation of ERG currents in HEK-H36/T1 (*open circles*) and GH_3 (*closed circles*) cells. *Continuous lines* correspond to Hill curves: $y = \text{base} + (\text{max} - \text{base})/[1 + (EC_{50}/x)^h]$ that best fitted the data. Values of the fitting parameters and number of cells tested at each hormone concentration are indicated in the graph. **b** Dose–response curves for the TRH-induced initial increase in $[Ca^{2+}]_i$ levels. $[Ca^{2+}]_i$ increases at the initial peak following TRH addition relative to the averaged Ca^{2+} level before adding TRH are shown. Data from HEK-H36/T1 and GH_3 cells are depicted as in panel A. **c** Effect of TRH-R overexpression on TRH-induced $[Ca^{2+}]_i$ increases in GH_3 cells. Data values were obtained from cells in which the fluorescence of the labelled TRH-R was detected (TRHR-YFP) or not (no TRHR), respectively. **d** Concentration dependence of the TRH effect on rERG currents from GH_3 cells overexpressing TRH-Rs. A dose–response curve corresponding to cells without exogenous TRH-Rs (*dotted line*) as in panel **a**, is also shown for comparison

PI3K-Akt signalling cascade by insulin via IGF-1 receptors has also been demonstrated [14].

Differences in the hormone concentration dependence of the ERG channel modulation as a function of the cell type

As indicated before, it seems unlikely that the observed differences in the components involved in the hormonal regulation of ERG channels as a function of the cell type, occur at the level of the TRH-R itself, since they are specific for the ERG current modulation without altering the TRH-induced calcium responses. It is evident that only the exogenously expressed TRH-R1 subtype of TRH-R is present in the heterologous HEK-H36/T1 system. Furthermore, only a single class of TRH binding sites has been recognized in the GH_3 pituitary cells that selectively express the TRH-R1 receptor [51]. Even though two alternatively spliced isoforms of TRH-R1 have been recognized in GH_3 cells [21],

they show almost identical affinities for TRH and display similar abilities to interact with G_q-like proteins, thus being able to activate the same signalling pathways [20, 22, 36]. To further explore the possible existence of differences in the coupling of the TRH-R to the signalling pathways, we compared the hormone concentration dependences for the Ca^{2+} and ERG responses in HEK-H36/T1 and GH_3 cells. When the dose dependence of the rERG inhibition and the $[Ca^{2+}]_i$ responses to TRH were examined in GH_3 cells, similar sigmoidal shaped curves were observed yielding extrapolated EC_{50} values of around 30 and 80 nM, respectively (Fig. 7a, b), close to the Kd of TRH for its receptor and to the EC_{50} for stimulation of inositol phosphate generation, electrical activity, and secretory responses in GH cells [2, 19, 46]. The TRH concentration dependence of the $[Ca^{2+}]_i$ response remained quite similar in the HEK-H36/T1 cells (EC_{50}=270 nM, Fig. 7b). Surprisingly, examination of the ability of the hormone to rightward shift the hERG I/V curves demonstrated a strong displacement of the EC_{50} for TRH to lower values of around 4 nM (Fig. 7a). This displacement was accompanied by a narrowing of the dose-response curve along the *x* axis, increasing the cellular Hill equivalent from 0.7 to 2.7, and yielding a maximum response at ca. 10 nM TRH.

It is known that the presence of spare receptors (also referred to as receptor reserve), a phenomenon of some second messenger-coupled receptor cascades in which a fraction of the receptor population is sufficient to maximally activate the effector population, can provide a mechanism for obtaining a response at lower agonist concentrations also increasing the Hill coefficient [17, 39, 46]. The presence of a receptor reserve would be consistent with a TRH-R overexpression in the HEK-H36/T1 cells. However, receptor number does not appear to be the sole determinant of hormone dependence, since the dose-response displacement is not similarly observed for the HEK-H36/T1 cells calcium response. To check for the possibility that the intrinsic cell composition could also be involved in the different modulation of ERG currents parameters, we studied the hormone concentration dependence of the Ca^{2+} and ERG responses in GH_3 cells in which the number of TRH-Rs was increased by transient transfection of fully functional TRH-Rs carrying a YFP fluorescent label at their carboxy terminus. The use of a labelled receptor not only allowed us to identify the successfully transfected cells, but also ensured that the individual fluorescent cells were indeed expressing a much larger amount of receptors than their non-fluorescent counterparts. As expected, the GH_3 cells overexpressing the receptor exhibited $[Ca^{2+}]_i$ responses showing some displacement toward lower hormone concentrations. However, unlike the modulation of the hERG kinetic parameters in HEK-H36/T1 cells, no significant differences in the Hill equivalent were caused by the increase in the cell receptor content (Fig. 7c). Finally, the strong shift in concentration dependence of the TRH-induced modulation of the HEK-H36/T1 hERG currents was not manifested on the inhibition of the endogenous rERG currents of the fluorescent transfected GH_3 cells (Fig. 7d). These data indicate that in addition to the increased number of receptors, some cellular factor(s) contribute differently to couple the receptor to the hERG channel modulation in the HEK-H36/T1 cells, further emphasizing the influence of the cell type in the molecular mechanism(s) involved in the TRH-evoked responses.

Discussion

The transduction pathway between TRH-R and the ERG K^+ channels has been partially established by our group and others in cell types in which the two elements are natively or heterologously expressed [3, 4, 6, 8, 23, 40, 47, 48]. Binding of TRH to its receptor at the plasma membrane initiates a variety of intracellular signalling events with distinct physiological outcomes. While studying the roles of various G proteins and downstream cellular effectors in the context of ERG inhibition by TRH in GH_3 and HEK-H36/T1 cells, we found several discrepancies between them, specifically regarding the coupling to G proteins and the implication of $\beta\gamma$ dimers in the transduction of the signal [40]. To critically address this issue, we have studied the biomolecular processes beyond G protein coupling in these cell types. Signalling pathways are typically studied using different cell lines, and knowledge is compiled assuming that the cell line background is not important. However, different cell lines may not respond to a particular stimulus in the same way since they may not have the same basic cellular machinery and may show differences in their transduction pathway dynamics [49, 59]. Our results here using GH_3 and HEK-H36/T1 cells show that the TRH pathway can implicate different downstream signalling elements in a cell-dependent way. We have also verified that those differences are not exclusively due to the overexpression of TRH-Rs in HEK-H36/T1 cells.

While Miranda et al. [40] described that regulation of ERG currents by TRH is coupled to G_s in GH_3 cells but not in HEK-H36/T1 cells, in this article we have analysed in depth the possible implication of $\beta\gamma$ dimers and Akt/PKB kinase in the transduction of the TRH signal to ERG. Thus we have studied the effects of several $\beta\gamma$ dimer scavengers such as β-ARK/CT [34] and phosducin [12], as well as the previously employed $G\alpha_t$ [40]. All three scavengers were able to significantly reduce the TRH-evoked rERG current inhibition in GH_3 cells, demonstrating an evident implication of $\beta\gamma$ dimers as a necessary element of the signalling in these cells. Noticeably, the role of the dimers is specific for the modulation of the GH_3 cell rERG currents, since the

presence of the scavengers did not modify the $G_{q/11}$- and PLC-dependent intracellular Ca^{2+} rise also caused by TRH in these cells. In contrast to the behaviour observed in GH_3 cells, none of the $\beta\gamma$ dimer scavengers was able to modify the hERG channels response to TRH in HEK-H36/T1 cells. Thus, whereas the transduction pathways activated by TRH in both cell types do share some common elements, they also implicate different ones converging on the same effector, i.e. the ERG channels. Since equivalent receptor and effectors are present in both cell types, such differences must rely on the cell-specific molecular compositions.

One of the proposed elements involved in the modulation of the endogenous pituitary cell ERG channels by TRH is a phosphorylation/dephosphorylation event [4, 23]. Whereas the possible implication of some specific protein kinases (e.g. PKA and PKC) in this effect has been discarded [23, 47, 48], the identity of the phosphorylating enzyme and the molecular target of its action remains unknown. Nevertheless, phosphorylation by PKA [32, 53] and PKC [18] (but see [52]) of heterologously expressed hERG channels has been recognized as a modulatory mechanism. Although the basal activity of Akt/PKB has been previously reported to be necessary for the correct function of hERG in HEK293 cells [58], no data about its possible implication in the hormone-induced regulation of the channel is available to date. To study the involvement of this kinase in the TRH response, we have used an RNAi strategy, using siRNA mixes derived from human or rat Akt1 sequences. These siRNA mixes strongly reduced (more than 80%) the expression of not only Akt1, but also of Akt2 and Akt3 that show between 71% and 82% identity with the corresponding human and rat Akt1. More importantly, whereas knocking down Akt expression did not affect the TRH-induced rERG modulation in GH_3 cells, it effectively impaired the HEK-H36/T1 cell hERG kinetic modifications induced by the hormone. The effect of the siRNA mix was specific and not an off-target one, since it was mimicked by a specific siRNA for the human Akt1 mRNA. Pharmacological inhibition of Akt/PKB activation with wortmannin and depletion of the PI3K/Akt route following a quite long-term pretreatment with insulin (an effective activator of this route) further demonstrated that Akt/PKB is indeed necessary for transduction of the signal from TRH-R to ERG channels in HEK-H36/T1 cells, but not in GH_3 cells. Apart from being the first demonstration of Akt/PKB participation in an ERG channel response to a hormonal stimulus, these data again emphasize the importance of the cell type in such a signal transduction. The final indication that this is the case is provided by our data showing a different hormone concentration dependence for the TRH-induced effects on ERG in GH_3 and HEK-H36/T1 cells.

Our findings raise the question as to what underlies the difference in TRH-R/G-protein/effector coupling seen between the two cell lines. At this moment, we cannot provide a definitive molecular explanation for the cell-dependent differences in this coupling. Since the same TRH-R is expressed in the GH_3 and the HEK-H36/T1 cells, such differences should lie distal to the receptor itself. It also seems unlikely that the very few amino acid changes (96% amino acid identity) between the rat and human ERG channel sequences [10] could explain the observed differences. Indeed, although it is plausible that some single amino acid alterations may affect the functional properties of the channels modifying their biophysical and/or regulatory characteristics, it has been demonstrated that hERG channels and their rat counterparts do not significantly differ in respect to their modulation by TRH when they are exogenously expressed in the same GH_3 cells [33, 48]. Also, the existence of a different set of auxiliary β subunits in the two cell types cannot be disregarded [54]. As an alternative, the possibility of an interaction of the receptor with different G proteins may explain the diverse mechanism(s) involved in ERG modulation. Whereas in many natural receptor systems the amount of G protein available for interaction with receptors is not limiting, in some cases the availability of G protein becomes a limitation [31]. This phenomenon can be observed more often in recombinant systems, where the natural stoichiometry is altered by expressing receptors in surrogate cells, opening up the possibility that the high levels of receptor expression may tend to produce saturation of stimulus–response mechanisms and to recruit other cellular response elements [31]. As a consequence, either through activation of more than one α-subunit of multiple G proteins or through a significant increase in $\beta\gamma$-subunits, the increased receptor expression level may change the observed response. Note, however, that although receptor overexpression has been shown to induce some promiscuous coupling to G proteins [15, 28, 38], this cannot fully explain the differences observed here, since some of them still remain after overexpressing the TRH-R in the GH_3 cells. This would also tend to disprove the hypothesis that an increased number of receptors leads to a higher dimerization/oligomerization level, a phenomenon previously detected with the TRH-R [25, 45, 50] that in some receptors has been shown to allow for a differential coupling to the transduction cascades [37, 44].

Another possibility to explain the observed differences is that the receptor/G-protein interaction is partially dependent upon the complement of downstream effectors present in each cell type. Thus, it has been shown that the efficiency of D3 dopamine receptor coupling to α-G_o is much greater in SH-SY5Y compared to HEK293 cells, despite a similar abundance of α-G_o in both cell types [57]. This led to the proposal that it is the endogenous level of the appropriate downstream effector(s) which determines the efficiency of specific receptor/G-protein interactions. It remains to be

established whether a similar mechanism is involved in the differences in the TRH-induced pathways.

In summary, the results presented here show that, besides using common elements for signal transduction such as the $G_{q/11}$-PLC route, TRH action also causes a cell-dependent regulation of the ERG channels through some different elements, since it implicates βγ dimers but not Akt/PKB in GH_3 cells, whereas in HEK-H36/T1 cells it implicates Akt/PKB but not βγ dimers. Noticeably, βγ dimers liberated by GPCRs from G_i proteins reportedly bind to and activate PI3Kγ [26, 29]. However, TRH-R coupling to G_i is not apparently involved in the modulation of rERG channels of the GH_3 cells, since the effect of TRH on rERG is not impaired by pertussis toxin [9, 40], and because the effect remains intact when the hormone is added to cells in which the continuous presence of saturating levels of an agonist (e.g. somatostatin and oxotremorine M) maintains activated classic inward rectifier K+ channels via G_i (Barros F. and Miranda P., unpublished results). This could explain the inability of the hormone to modulate the GH_3 rERG current via Akt/PKB. It would also be consistent with our proposal that a specific set of βγ subunits released from a G_s or G_{13} transducer is responsible for the TRH-induced ERG regulation in the GH_3, but not in the HEK-H36/T1 cells [40]. Further work would be necessary to identify other molecular components of the signalling cascade leading to the Akt/PKB-dependent modulation of hERG in this heterologous cell expression system.

Acknowledgements We thank Teresa González for the technical assistance and Dr. Kevin Dalton for proof reading the text. We also thank Dr. Angel Martínez-Nistal, head of the Scientific and Technical Services of the University of Oviedo, for the loan of the epifluorescence light source for our patch-clamp setup. This work was supported in part by Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) Grant BFU2009-11262 and Spanish Ion Channel Initiative (SICI) Consolider-Ingenio Project CSD2008-00005. L.C. and J. F-T were supported by predoctoral fellowships from the Ministerio de Educación y Ciencia (MEC) and the Fondo de Investigación Científica y Técnica (FICYT) of Spain. A.M. holds a postdoctoral contract from SICI-Consolider 2008.

References

1. Alonso-Ron C, Barros F, Manso DG, Gómez-Varela D, Miranda P, Carretero L, Domínguez P, de la Peña P (2009) Participation of HERG channel cytoplasmic structures on regulation by the G protein-coupled TRH receptor. Pflügers Arch 457:1237–1252
2. Barros F, Delgado LM, Maciá C, de la Peña P (1991) Effects of hypothalamic peptides on electrical activity and membrane currents of "patch perforated" clamped GH_3 anterior pituitary cells. FEBS Lett 279:33–37
3. Barros F, Delgado LM, del Camino D, de la Peña P (1992) Characteristics and modulation by thyrotropin-releasing hormone of an inwardly rectifying K^+ current in patch-perforated GH_3 anterior pituitary cells. Pflügers Arch 422:31–39
4. Barros F, Mieskes G, del Camino D, de la Peña P (1993) Protein phosphatase 2A reverses inhibition of inward rectifying K^+ currents by thyrotropin-releasing hormone in GH_3 pituitary cells. FEBS Lett 336:433–439
5. Barros F, Villalobos C, García-Sancho J, del Camino D, de la Peña P (1994) The role of the inwardly rectifying K^+ current in resting potential and thyrotropin-releasing hormone-induced changes in cell excitability of GH_3 rat anterior pituitary cells. Pflügers Arch 426:221–230
6. Barros F, del Camino D, Pardo LA, Palomero T, Giráldez T, de la Peña P (1997) Demonstration of an inwardly rectifying K^+ current component modulated by thyrotropin-releasing hormone and caffeine in GH_3 rat anterior pituitary cells. Pflügers Arch 435:119–129
7. Barros F, Gomez-Varela D, Viloria CG, Palomero T, Giráldez T, de la Peña P (1998) Modulation of human erg K+ channel gating by activation of a G protein-coupled receptor and protein kinase C. J Physiol 511:333–346
8. Bauer CK, Meyerhof W, Schwarz JR (1990) An inward-rectifying K^+ current in clonal rat pituitary cells and its modulation by thyrotropin-releasing hormone. J Physiol 429:169–189
9. Bauer CK, Davison I, Kubasov I, Schwarz JR, Mason WT (1994) Different G proteins are involved in the biphasic response of clonal rat pituitary cells to thyrotropin-releasing hormone. Pflügers Arch 428:17–25
10. Bauer CK, Engeland B, Wulfsen I, Ludwig J, Pongs O, Schwarz JR (1998) RERG is a molecular correlate of the inward-rectifying K current in clonal rat pituitary cells. Recept Channels 6:19–29
11. Beitner-Johnson D, LeRoith D (1995) Insulin-like growth factor-I stimulates tyrosine phosphorylation of endogenous c-Crk. J Biol Chem 270:5187–5190
12. Blüml K, Schnepp W, Schröder S, Beyermann M, Macias M, Oschkinat H, Lohse MJ (1997) A small region in phosducin inhibits G-protein betagamma-subunit function. EMBO J 16:4908–4915
13. Brazil DP, Hemmings BA (2001) Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. Trends Biochem Sci 26:657–664
14. Castillo AI, Tolon RM, Aranda A (1998) Insulin-like growth factor-1 stimulates rat prolactin gene expression by a Ras, ETS and phosphatidylinositol 3-kinase dependent mechanism. Oncogene 16:1981–1991
15. Chabre O, Conklin BR, Brandon S, Bourne HR, Limbird LE (1994) Coupling of the α_{2A}-adrenergic receptor to multiple G-proteins. A simple approach for estimating receptor-G-protein coupling efficiency in a transient expression system. J Biol Chem 267:5730–5734
16. Chiang C-E, Roden DM (2000) The long QT syndromes: genetic basis and clinical implications. J Am Coll Cardiol 36:1–12
17. Cleland TA, Linster C (1999) Concentration tuning mediated by spare receptor capacity in olfactory sensory neurons: a theoretical study. Neural Comput 11:1673–1690
18. Cockerill SL, Tobin AB, Torrecilla I, Willars GB, Standen NB, Mitcheson JS (2007) Modulation of hERG potassium currents in HEK-293 cells by protein kinase C. Evidence for direct phosphorylation of pore forming subunits. J Physiol 581:479–493
19. de la Peña P, Delgado LM, del Camino D, Barros F (1992) Cloning and expression of the thyrotropin-releasing hormone receptor from GH_3 rat anterior pituitary cells. Biochem J 284:891–899
20. de la Peña P, Delgado LM, del Camino D, Barros F (1992) Two isoforms of the thyrotropin-releasing hormone receptor generated by alternative splicing have indistinguishable functional properties. J Biol Chem 267:25703–25708
21. Franke TF (2008) PI3K/Akt: getting it right matters. Oncogene 27:6473–6488
22. Gershengorn MC, Osman R (1996) Molecular and cellular biology of thyrotropin-releasing hormone receptors. Physiol Rev 76:175–191

23. Gómez-Varela D, Giráldez T, de la Peña P, Dupuy SG, García-Manso D, Barros F (2003) Protein kinase C is necessary for recovery from the thyrotropin-releasing hormone-induced rERG current reduction in GH_3 rat anterior pituitary cells. J Physiol 547:913–929
24. Hanada M, Feng J, Hemmings BA (2004) Structure, regulation and function of PKB/AKT—a major therapeutic target. Biochim Biophys Acta 1697:3–16
25. Hanyaloglu AC, Seeber RM, Kohout TA, Lefkowitz RJ, Eidne KA (2002) Homo- and hetero-oligomerization of thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor subtypes. Differential regulation of beta-arrestins 1 and 2. J Biol Chem 277:50422–50430
26. Hawkins PT, Anderson KE, Davidson K, Stephens LR (2006) Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells. Biochem Soc Trans 34:647–662
27. Hayakawa J, Ohmichi M, Tasaka K, Kanda Y, Adachi K, Nishio Y, Hisamoto K, Mabuchi S, Hinuma S, Murata Y (2002) Regulation of the PRL promoter by Akt through cAMP response element binding protein. Endocrinology 143:13–22
28. Hermans E (2003) Biochemical and parmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors. Pharmacol Ther 99:25–44
29. Hirsch E, Costa C, Ciraolo E (2007) Phosphoinositide 3-kinases as a common platform for multi-hormone signalling. J Endocrinol 194:243–256
30. Keating MT, Sanguinetti MC (2001) Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias. Cell 104:569–580
31. Kenakin T (1997) Differences between natural and recombinant G protein-coupled receptor systems with varying receptor/G protein stoichiometry. Trends Pharmacol Sci 18:456–464
32. Kiehn J (2000) Regulation of the cardiac repolarizing HERG potassium channel by protein kinase A. Trends Cardiovasc Med 10:205–209
33. Kirchberger NM, Wulfsen I, Schwarz JR, Bauer CK (2006) Effects of TRH on heteromeric rat erg1a/1b K^+ channels are dominated by the rerg1b subunit. J Physiol 571:27–42
34. Koch WJ, Hawes BE, Inglese J, Luttrell LM, Lefkowitz RJ (1994) Cellular expression of the carboxyl terminus of a G protein-coupled receptor kinase attenuates G beta gamma-mediated signalling. J Biol Chem 269:6193–6197
35. Lavan BE, Fantin VR, Chang ET, Lane WS, Keller SR, Lienhard GE (1997) A novel 160-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated embryonic kidney cells is a new member of the insulin receptor substrate family. J Biol Chem 272:21403–21407
36. Lee TW, Anderson LA, Eidne KA, Milligan G (1995) Comparison of the signalling properties of the long and short isoforms of the rat thyrotropin-releasing-hormone receptor following expression in Rat-1 fibroblasts. Biochem J 310:291–298
37. Lohse MJ (2010) Dimerization in GPCR mobility and signalling. Curr Opin Pharmacol 10:53–58
38. MacNulty EE, McClue SJ, Carr IC, Jess T, Wakelam MJO, Milligan G (1992) α_2-C10 adrenergic receptors expressed in Rat 1 fibroblasts car regulate both adenylylcyclase and phospholipase D-mediated hydrolysis of phosphatidylcholine by interacting with pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide-binding proteins. J Biol Chem 267:2149–2156
39. Matthews JC (1993) Fundamentals of receptor, enzyme and transport kinetics. CRC, FL, USA
40. Miranda P, Giráldez T, de la Peña P, Manso DG, Alonso-Ron C, Gómez-Varela D, Domínguez P, Barros F (2005) Specificity of TRH-R coupling to G-proteins for regulation of ERG K^+ channels in GH_3 rat anterior pituitary cells. J Physiol 566:717–736
41. Miranda P, Manso DG, Barros F, Carretero L, Hughes TE, Alonso-Ron C, Domínguez P, de la Peña P (2008) FRET with multiply labeled HERG K^+ channels as a reporter of the in vivo coarse architecture of the cytoplasmic domains. Biochim Biophys Acta 1783:1681–1699
42. Nakanishi S, Catt KJ, Balla T (1995) A wortmannin-sensitive phosphatidylinositol 4-kinase that regulates hormone-sensitive pools of inositolphospholipids. Proc Natl Acad Sci USA 92:5317–5321
43. Palomero T, Barros F, del Camino D, Viloria CG, de la Peña P (1998) A G protein $\beta\gamma$ dimer-mediated pathway contributes to mitogen-activated protein kinase activation by thyrotropin-releasing hormone receptors in transfected COS-7 cells. Mol Pharmacol 53:613–622
44. Park PS, Palczewski K (2005) Diversifying the repertoire of G protein-coupled receptors through oligomerization. Proc Natl Acad Sci USA 102:8793–8794
45. Pfleger KD, Kroeger KM, Eidne KA (2004) Receptors for hypothalamic releasing hormones TRH and GnRH: oligomerization and interactions with intracellular proteins. Semin Cell Dev Biol 15:269–280
46. Ramsdell JS, Tashjian AH Jr (1986) Thyrotropin-releasing hormone (TRH) elevation of inositol trisphosphate and cytosolic free calcium is dependent on receptor number. Evidence for multiple rapid interactions between TRH and its receptor. J Biol Chem 261:5301–5306
47. Schäfer R, Wulfsen I, Behrens S, Weinsberg F, Bauer CK, Schwarz JR (1999) The erg-like current in rat lactotrophs. J Physiol 518:401–416
48. Schledermann W, Wulfsen I, Schwarz JR, Bauer CK (2001) Modulation of rat erg1, erg2, erg3 and HERG K^+ currents by thyrotropin-releasing hormone in anterior pituitary cells via the native signal cascade. J Physiol 532:143–163
49. Selkirk JV, Price GW, Nahorski SR, Challiss RA (2001) Cell type-specific differences in the coupling of recombinant mGlu1alpha receptors to endogenous G protein sub-populations. Neuropharmacology 40:645–656
50. Song GJ, Jones BW, Hinkle PM (2007) Dimerization of the thyrotropin-releasing hormone receptor potentiates hormone-dependent receptor phosphorylation. Proc Natl Acad Sci USA 104:18303–18308
51. Sun Y, Lu X, Gershengorn MC (2003) Thyrotropin-releasing hormone receptors – similarities and differences. J Mol Endocrinol 30:87–97
52. Thomas D, Zhang W, Wu K, Wimmer A-B, Gut B, Wendt-Nordahl G, Kathöfer S, Kreye VAW, Katus HA, Schoels KJ, Karle CA (2003) Regulation of HERG potassium channel activation by protein kinase C independent of direct phosphorylation of the channel protein. Cardiovasc Res 59:14–26
53. Thomas D, Kiehn J, Katus HA, Karle CA (2004) Adrenergic regulation of the rapid component of the cardiac delayed rectifier potassium current, IKr, and the underlying hERG ion channel. Basic Res Cardiol 99:279–287
54. Vacher H, Trimmer JS (2011) Diverse roles for auxiliary subunits in phosphorylation-dependent regulation of mammalian brain voltage-gated potassium channels. Pflugers Arch 462:631–643
55. Wanke E, Restano-Cassulini R (2006) Toxins interacting with *ether-a-go-go*-related gene voltage-dependent potassium channels. Toxicon 49:239–248
56. Weinsberg F, Bauer CK, Schwarz JR (1997) The class III antiarrhythmic agent E-4031 selectively blocks the inactivating inward-rectifying potassium current in rat anterior pituitary tumor cells (GH_3/B6 cells). Pflügers Arch 434:1–10
57. Zaworski PG, Alberts GL, Pregenzer JF, Im WB, Slightom JL, Gill GS (1999) Efficient functional coupling of the human D3 dopamine receptor to G(o) subtype of G proteins in SH-SY5Y cells. Br J Pharmacol 128:1181–1188

58. Zhang Y, Wang H, Wang J, Han H, Nattel S, Wang Z (2003) Normal function of HERG K^+ channels expressed in HEK293 cells requires basal protein kinase B activity. FEBS Lett 534:125–132
59. Zhang Y, Opresko L, Shankaran H, Chrisler WB, Wiley HS, Resat H (2009) HER/ErbB receptor interactions and signalling patterns in human mammary epithelial cells. BMC Cell Biol 10:78–92
60. Zhou Z, Gong Q, Ye B, Fan Z, Makielski JC, Robertson GA, January CT (1998) Properties of HERG channels stably expressed in HEK 293 cells studied at physiological temperature. Biophys J 74:230–241

BJ Cell

View this PDF in Utopia Documents for more interactive functionality
Download FREE software now

Biochem. J. (2013) **451**, 463–474 (Printed in Great Britain) doi:10.1042/BJ20121717

online data

Mapping of interactions between the N- and C-termini and the channel core in HERG K^+ channels

Pilar DE LA PEÑA[1], Angeles MACHÍN, Jorge FERNÁNDEZ-TRILLO, Pedro DOMÍNGUEZ and Francisco BARROS[1]

Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Oviedo, 33006 Oviedo, Spain

The characteristic gating properties of the HERG [human *eag* (*ether-a-go-go*)-related gene] potassium channel determine its contribution to cardiac repolarization and in setting the electrical behaviour of a variety of cells. In the present study we analysed, using a site-directed cysteine and disulfide chemistry approach, whether the *eag*/PAS (Per/Arnt/Sim) and proximal domains at the HERG N-terminus exert a role in controlling the access of the N-terminal flexible tail to its binding site in the channel core for interaction with the gating machinery. Whereas the *eag*/PAS domain is necessary for disulfide bridging, plus the cysteine residues introduced at positions 3 and 542 of the HERG sequence, the presence of the proximal domain seems to be dispensable. The state-dependent formation of a disulfide bridge between Cys^3 and an endogenous cysteine residue at position 723 in the C-terminal C-linker suggests that the N-terminal tail of HERG can also get into close proximity with the C-linker structures located at the bottom of helix S6. Therefore the intrinsic flexibility of the N-tail and its proximity to both the S4–S5 loop and the C-linker may dynamically contribute to the modulation of HERG channel gating.

Key words: cytoplasmic domain, disulfide bridging, *ether-a-go-go*-related gene, gating modulation, potassium channel, structure–function relationship.

INTRODUCTION

The HERG [human *eag* (*ether-a-go-go*)-related gene; type 1 or Kv11.1) potassium channels play a key role in setting the electrical behaviour of a variety of cell types (reviewed in [1]) and, in particular, they conduct the cardiac repolarizing current I_{Kr} [1–3]. Thus the loss of HERG function by mutation or pharmacological block prolongs cardiac repolarization causing LQT2 (type-2 long-QT) syndrome and increases the risk of ventricular arrhythmia and sudden death [2,4–9].

X-ray crystal-based structures have provided a wealth of detail into the structural basis of voltage-dependent K^+ channel permeation and gating [1,10–12]. However, it is usually difficult to assign those structures to specific functional protein states and to ascertain whether they accurately represent the protein conformation in its native membrane environment. Site-directed mutagenesis and voltage-clamp analysis of mutant ion channels provides a function-based approach, complementary to high-resolution structural methods, that helps to understand the structural basis of channel functionality. Site-directed cysteine and disulfide chemistry can be used to map out contacts between pairs of positions and to demonstrate physical proximity between protein sequences carrying the pair of introduced cysteine residues [13]. Thus measurement of selective, state-dependent and DTT (dithiothreitol)-reversible current attenuation in double cysteine mutant channels under oxidizing conditions may yield important information about close proximity and relative positioning of particular protein domains and/or their conformational rearrangements in fully functional channels present on the cell surface. In a recent study, we used this approach to demonstrate the existence of a physical proximity between the HERG N-terminal distal region of the *eag*/PAS (Per/Arnt/Sim) domain (amino acids 1–135; Figure 1) and the loop linking the S4 and S5 transmembrane helices in the channel core [14]. It has been clearly established that the distinctive gating properties of HERG are strongly influenced by specific cytoplasmic domains. Thus it is widely accepted that the interaction between the aforementioned two regions acts as a critical determinant of the characteristic slow deactivation of HERG [1,14–19], and it has been reported that both the PAS homology domain (amino acids 26–135) and the remainder of the N-terminus up to the first transmembrane helix (the proximal domain corresponding to residues 136–397) play important roles in the activation and deactivation properties of the channel [1]. It has also been proposed that some residues at the beginning of the HERG C-terminus [either in the 'C-linker' or in the cNBD (cyclic nucleotide-binding domain) homologous region], could interact with the PAS domain or the N-terminal region of the N-terminus to control deactivation gating [15,20–22]. In addition, recent NMR data identified two differentiated regions in the distal segment preceding the PAS domain (in the N-tail or CAP domain [15]): an initial disordered and highly mobile tail extending up to amino acid 12, and an amphipathic helix encompassing residues 13–23 [16,17,20], both of them participating in modulation of HERG deactivation characteristics [14,17,18]. Overall, the available data favour the existence of an extensive network of interactions between cytoplasmic domains involving several N- and C-terminal regions and the S4–S5 linker, that dynamically contribute to modulate HERG gating ([14,18]; reviewed in [1,15,19]).

In the present study we analyse the role of the *eag*/PAS and the proximal N-terminal domains in determining the position and controlling the access of the N-terminal tail of HERG to its binding site in the channel core for interaction with the gating machinery. We checked the impact that structural alterations in these regions of the HERG N-terminus exert on disulfide bridge formation between cysteine residues introduced at positions 3 and 542 of the channel sequence. Our results indicate that, whereas the presence of an intact PAS domain is necessary for the interaction between the N-terminal tail and the S4–S5 linker, maintenance of the HERG exclusive long proximal domain is not. Moreover, the observation that a disulfide cross-linkage is formed between

Abbreviations used: cNBD, cyclic nucleotide-binding domain; DTT, dithiothreitol; *eag*, *ether-a-go-go*; HERG, human *ether-a-go-go*-related gene; LQT2, type-2 long-QT; PAS, Per/Arnt/Sim; $TbHO_2$, t-butyl hydroperoxide.

[1] Correspondence may be addressed to either of these authors (email pdelapena@uniovi.es or fbarros@uniovi.es).

© The Authors Journal compilation © 2013 Biochemical Society

Biochemical Journal www.biochemj.org

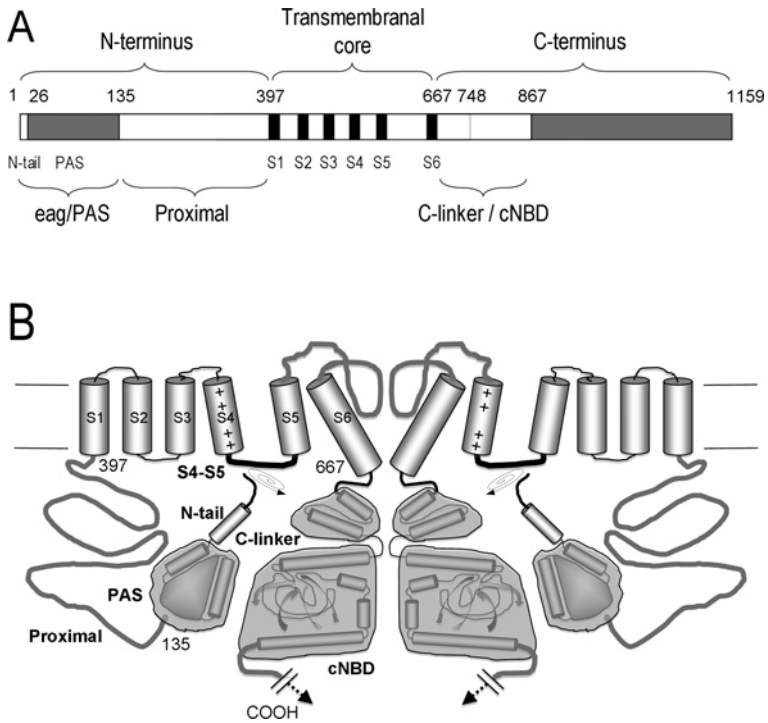


Figure 1 Schematic representation of the structural organization of the HERG K^+ channel

(**A**) Schematic linear diagram of the HERG channel protein. The six transmembrane helices are shown as black boxes. The size of each domain is represented proportional to the total length of the protein. The position of the boundaries between the different channel domains is indicated with numbers. (**B**) Schematic representation of two α-subunits of a four-subunit HERG channel tetramer. The S1–S4 transmembrane helical segments that make up the voltage-sensor domain are linked via an S4–S5 linker (black line) to the pore-forming domains (S5 and S6 segments). Both the N- and C-terminal regions are intracellular. At the N-terminus, the amphipathic helix (residues 10–23) and the PAS homologous domain (residues 26–134) are depicted as a small cylinder and a spherical structure respectively. The flexible N-terminal tail region is depicted with a dotted line. The HERG exclusive proximal domain of the N-terminus (residues 135–397) is represented as a grey line connected to the S1 helix. At the C-terminus, the C-linker and cNBD domains are depicted as a pair of cylinders and some cylinders and sheets encompassed in grey blocks respectively.

residue 3 and an endogenous cysteine residue located at position 723 of the C-linker of a channel containing a specific small deletion in the proximal domain, also suggests that both regions can interact and hence that the initial portion of the HERG N-terminus and the C-linker structures immediately located at the bottom of helix S6 lie in close proximity.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and molecular biology

The oxidizing agent $TbHO_2$ (t-butyl hydroperoxide; Sigma) was diluted in the recording solution shortly before experiments. DTT (Sigma and Fluka) was dissolved in this experimental medium immediately before use.

Procedures for the generation of the N-terminal deletion variants Δ138–373, Δ223–373, Δ326–373 and Δ5–135 have been detailed elsewhere [23–27]. Generation of construct V3C Δ10–23 was performed using a forward PCR mutagenic primer containing a HindIII site and including the coding sequence for the first nine residues of HERG with the mutation V3C followed by the coding sequence for residues 24–40. The reverse PCR primer contained the coding sequence corresponding to amino acids 360–376 and the unique BstEII recognition site. The resulting PCR amplified fragment was digested with HindIII/BstEII, purified and used to replace the corresponding native fragment in the full-length HERG in the pSP64A + vector. The point mutations V3C, Y542C, KKR/AAA, C723G + C729G, C740G + C750G, C723A and C729A were created by site-directed mutagenesis using the PCR-based overlap extension method as previously described [14,23–26]. The construct with a duplicated proximal domain sequence was generated by inserting a PCR amplified BstEII-digested fragment encompassing the coding region from residues 138 to 374 into the unique BstEII recognition site at residue 374 of the wild-type channel. Finally, to generate HERG channel constructs bearing the different point mutations combined with either of the various deletions or with the duplicated proximal domain sequence, restriction fragments from channels carrying the point mutations were used to replace the corresponding wild-type fragments in the various deletion HERG variants. All constructs were analysed by standard fluorescence-based DNA sequencing to confirm the mutations and verify the absence of errors.

For *in vitro* cRNA synthesis, HERG constructs cloned in the pSP64A + vector were linearized and capped cRNA was synthesized from the linear cDNA templates by standard methods using SP6 RNA polymerase as described previously [14,23–27]. Procedures for *Xenopus laevis* anaesthesia and surgery, obtaining oocytes and microinjection conditions have been detailed elsewhere [14,22–26]. Microinjected oocytes were incubated in OR-2 medium (82.5 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM $CaCl_2$, 2 mM $MgCl_2$, 1 mM Na_2HPO_4 and 10 mM Hepes, pH 7.5) containing 25 μg/ml gentamicin for 2–3 days before HERG current recordings.

Electrophysiology and measurement of the oxidation–reduction effects

HERG currents were measured in manually defolliculated oocytes using the two-electrode voltage-clamp method as described

© The Authors Journal compilation © 2013 Biochemical Society

previously [14,23–27]. Recordings were usually obtained in standard OR-2 medium. For those constructs showing a reduced level of functional expression, high-K^+ OR-2 medium in which 50 mM KCl replaced an equivalent amount of NaCl was used to maximize currents. Parallel experiments with several single and double cysteine mutants indicated that the extent and kinetics of the oxidation and reduction effects were the same in both solutions. Membrane potential was typically clamped at -80 mV, except for constructs showing a left shift in voltage dependence of activation (e.g. proximal domain deleted channels [23–25]), in which a -100 mV basal voltage was used to compensate for this shift, thus preventing partial current activation at holding potential. Where indicated, a holding potential of $+40/+60$ mV was used to maintain the channels open/inactivated during the oxidation treatments. Ionic currents sampled at 1 kHz were elicited using the voltage protocols indicated in the Figures. To prevent any influence of the oxidizing and reducing agents on the silver chloride ground electrodes, they were connected to the bath chamber through agar bridges. Stimulation and data acquisition were controlled with Pulse + PulseFit software (HEKA Elektronic) running on Macintosh computers. Quantification of the oxidizing agent effects was systematically performed after 2–3 min of treatment, followed by a phase of reversion with DTT. As shown previously [14], this prevented the sizeable accumulation of non-disulfide products (e.g. sulfinic and sulfenic oxyacids) owing to slower and DTT-irreversible oxidation reactions associated with longer $TbHO_2$ treatments.

Data analysis

Data analysis and exponential fits to ionic currents and time courses were performed with the programs PulseFit (HEKA Elektronic) and Igor-Pro (WaveMetrics). Data values given in the text and/or the Figures with error bars represent the means $\pm$ S.E.M. for the number of indicated cells, always coming from at least two different frog donors. Comparisons between data groups were at first performed by parametric Student's impaired *t* test (two tailed). When significant differences in S.D. were present, an alternate Welch's test or non-parametric Wilcoxon or Mann–Whitney test was also used. In all cases, P values <0.05 were considered as indicative of statistical significance.

RESULTS

Disulfide bond formation between the N-terminal-most region of HERG and the S4–S5 linker requires an intact *eag*/PAS domain

Site-directed cysteine mutagenesis and disulfide chemistry is a valuable method to map contacts between pairs of amino acids at specific molecular positions and to demonstrate the physical proximity between protein sequences carrying the introduced cysteine residues [13,14]. Recently, we have been able to demonstrate disulfide bond formation between the distal portion of the HERG N-terminus and the S4–S5 linker by introducing cysteine residues into specific positions of these two channel domains and measuring the selective, state-dependent and DTT-reversible elimination of the double-mutant currents under oxidizing conditions [14]. For this purpose, we studied the effects of redox-dependent disulfide bonding after application of the membrane-permeable oxidizing agent $TbHO_2$ to oocytes expressing the constructs carrying the engineered cysteine residues. Using an analogous strategy, we have attempted to determine some of the key structural requirements for this interaction to take place. Considering the previous observations that particular regions of the channel's N-terminus can differently modulate activation and deactivation gating and hormonal regulation [23–25,27], we studied the effect of the oxidizing agent in channels with specific deletions, affecting either the *eag*/PAS domain or different sections of the proximal domain (Figure 1). As shown in Figures 2(A) and 2(B), the oxidation induced a rapid (inhibition time constant 57.5 ± 2.8 s, $n=6$) and strong (65.0 ± 2.9 %) reduction of the current mediated by a channel construct with two engineered cysteine residues at Val^3 and Tyr^{542} (double mutant V3C + Y542C). This effect is abolished if a Δ5–135 deletion that eliminates the *eag*/PAS domain is introduced (construct V3C + Δ5–135 + Y542C). Thus this construct only exhibited a slow (time constant 150 ± 6.5 s, $n=4$) and limited (17.5 ± 1.1 %) inhibition of the current magnitude, equivalent to that observed upon oxidation of single-cysteine containing channels V3C (243 ± 20 s, 21.0 ± 1.6 %, $n=10$), V3C + Δ5–135 (344 ± 60 s, 24.5 ± 7.1 %, $n=4$) and Y542C [14].

The *eag*/PAS domain in the HERG N-terminus contains at least two structural elements: the highly structured PAS homologous domain extending from residues 26 to 135, and a distal N-terminal segment encoded by amino acids 1–25 [14,15,18,28]. Indeed, NMR data identified two differentiated regions in this distal segment, an initial disordered and highly mobile tail extending up to amino acid 12, and an amphipathic helix encompassing residues 13–23 ([16,17,20]; Figure 1). To evaluate the relative contribution of the PAS and the amphipatic helix to the oxidation-induced effect in the V3C + Y542C channels, we also generated a construct carrying the double cysteine mutation and lacking only residues 10–23 corresponding to the amphipathic helix. Addition of $TbHO_2$ to oocytes expressing the V3C + Δ10–23 + Y542C channel construct still induced a rapid and marked current reduction with an inhibition time constant of 65.8 s, and a current magnitude lowered by 53.4 ± 3.4 % ($n=6$) after an oxidation period of 3 min (Figure 2). It is possible that the relatively smaller oxidation-induced effects caused by the elimination of the amphipathic helix in the V3C + Δ10–23 + Y542C construct are due to some slight variation in the relative position of the N-terminal tail and the S4–S5 linker. However, the results also indicate that the impact of this structural modification is considerably lower than that observed when almost the entire highly structured *eag*/PAS domain is deleted in the V3C + Δ5–135 + Y542C construct.

Formation of a disulfide bond between residues V3C and Y542C does not require the presence of the proximal domain of the N-terminus

The *eag*/PAS domain of HERG is followed by an almost 250-residue-long stretch of amino acids (the proximal domain) extending up to the first transmembrane helix (Figure 1), which is able to influence both activation and deactivation gating under certain conditions [1,23,25]. To test the relevance of this HERG exclusive domain on oxidation-induced disulfide bond formation between V3C and Y542C, we studied the $TbHO_2$ effects in oocytes expressing double cysteine mutants in which the proximal domain was either partially (V3C + Δ223–373 + Y542C and V3C + Δ326–373 + Y542C) or almost completely (V3C + Δ138–373 + Y542C) deleted. Unlike the results observed in the absence of the *eag*/PAS domain, an effect analogous to that observed in the double mutant V3C + Y542C was induced by $TbHO_2$ in the proximal domain-deleted V3C + Δ138–373 + Y542C channel as well as in the channel construct lacking a smaller portion of the proximal domain corresponding to residues 326–373 (Figure 3). A slightly

© The Authors Journal compilation © 2013 Biochemical Society

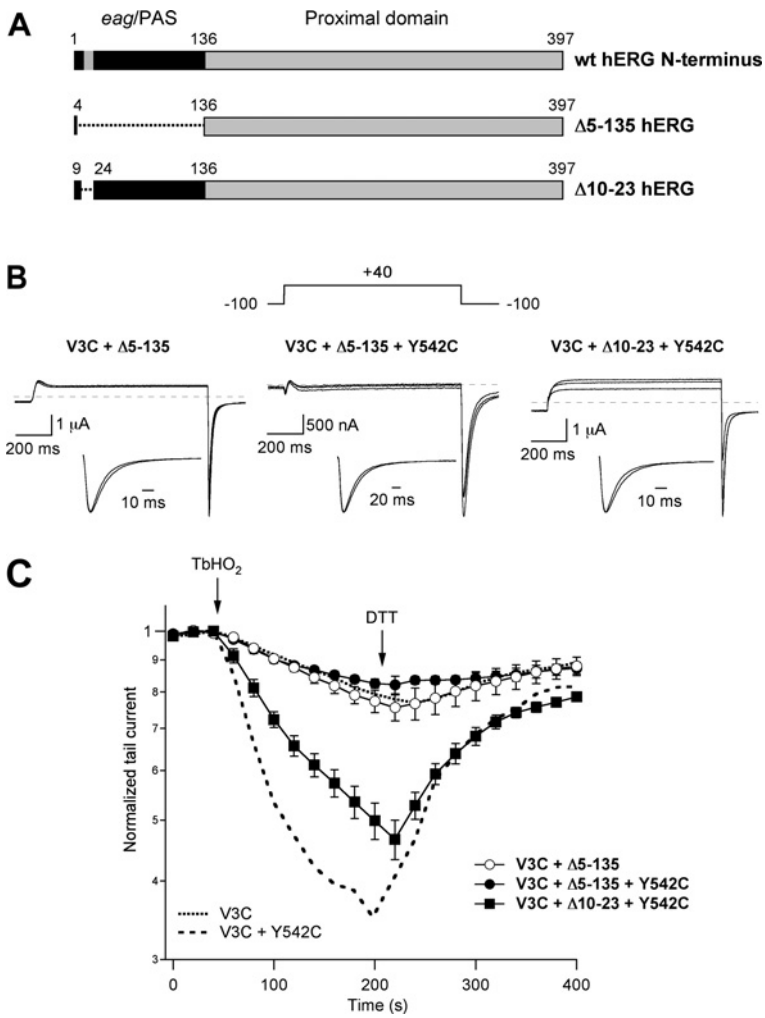


Figure 2 Effect of deletions in the *eag*/PAS domain of the HERG N-terminus on establishment of disulfide bridges between cysteine residues at positions 3 and 542

(**A**) Schematic diagram of the HERG N-terminus in wild-type and deletion mutants. The regions corresponding to the *eag*/PAS (residues 1–136), the proximal domain up to the first transmembrane helix and the portions corresponding to amino acids 1–12 and 13–23 encompassing the initial flexible tail and the amphipathic helix respectively, are represented in the scheme. Internal deletions are marked as dashed lines. The size of each domain and the length of the deletions are represented proportional to the total length of the N-terminus. (**B**) Effect of the oxidation/reduction treatment on HERG currents from cysteine-engineered channels carrying deletions in the *eag*/PAS domain. The ion currents were recorded from voltage-clamped *Xenopus* oocytes in response to the indicated pulse protocol designed to activate/inactivate and deactivate the HERG channels. The results correspond to channels carrying single or double cysteine substitutions at residues 3 (V3C) or 3 and 542 (V3C + Y542C) of the HERG sequence from which the whole *eag*/PAS (Δ5–135) or only the N-terminal amphipathic helix (Δ10–23) have also been deleted. Current traces obtained following stabilization of the tail current magnitudes, 2–3 min after application of 2 mM $TbHO_2$ and 5 min after substituting the oxidizing agent by 5 mM DTT, are shown superimposed. The trace showing the smaller tail current size always corresponds to $TbHO_2$ treatment. Extracellular high-K^+ OR-2 medium containing 50 mM KCl was used to record currents. Expanded tail current traces normalized to peak before and after adding $TbHO_2$ are shown in the insets. The trace showing a slightly faster rate of decay always corresponds to $TbHO_2$ treatment. (**C**) Time course of peak tail current variation. Tail current magnitudes normalized to the value obtained immediately before $TbHO_2$ addition are shown for V3C + Δ5–135 ($n = 4$), V3C + Δ5–135 + Y542C ($n = 4$) and V3C + Δ10–23 + Y542C ($n = 5$) channel constructs. Data points represent the means ± S.E.M. of normalized current magnitudes. Data from single V3C (dotted line, $n = 10$) and double V3C + Y542C (dashed line, $n = 6$) mutant channels without any deletion [14] are also shown for comparison.

enhanced oxidation effect was obtained in V3C and Y542C channels also lacking residues 223–373 (82.5 ± 4.7 % inhibition, $n = 8$, for V3C + Δ223–373 + Y542C channels compared with 65.5 ± 4.3 %, $n = 6$, for V3C + Y542C; $P < 0.05$). These results demonstrate that the proximal domain is not necessary for formation of the disulfide bond between residues V3C and Y542C, and hence it does not act as the determinant factor for positioning the N-terminal tail towards its interaction site in the channel core. Consistent with this, the oxidation effects were also almost the same in a V3C + Y542C channel in which the proximal domain sequence corresponding to residues 137–374 was duplicated, yielding a 250 amino acid longer N-terminus (V3C + 2×Proximal + Y542C construct, 56.2 ± 4.4 % inhibition, $n = 3$). Finally, the identification of a positively charged amino acid cluster inside the 326–373 segment (residues 362–366 encompassing the sequence KIKER using the one-letter amino acid code) acting as an important determinant of HERG activation characteristics [1,24,29], prompted us to check whether the effect of $TbHO_2$ on the double cysteine mutant could be affected by elimination of these positive charges. However, the oxidation effect on a double cysteine mutant also mutated to lack the positive charges in the KIKER sequence (construct V3C + KKR/AAA + Y542C, 70.5 ± 4.9 % inhibition, $n = 3$) was equivalent to that observed for the double mutant V3C + Y542C.

© The Authors Journal compilation © 2013 Biochemical Society

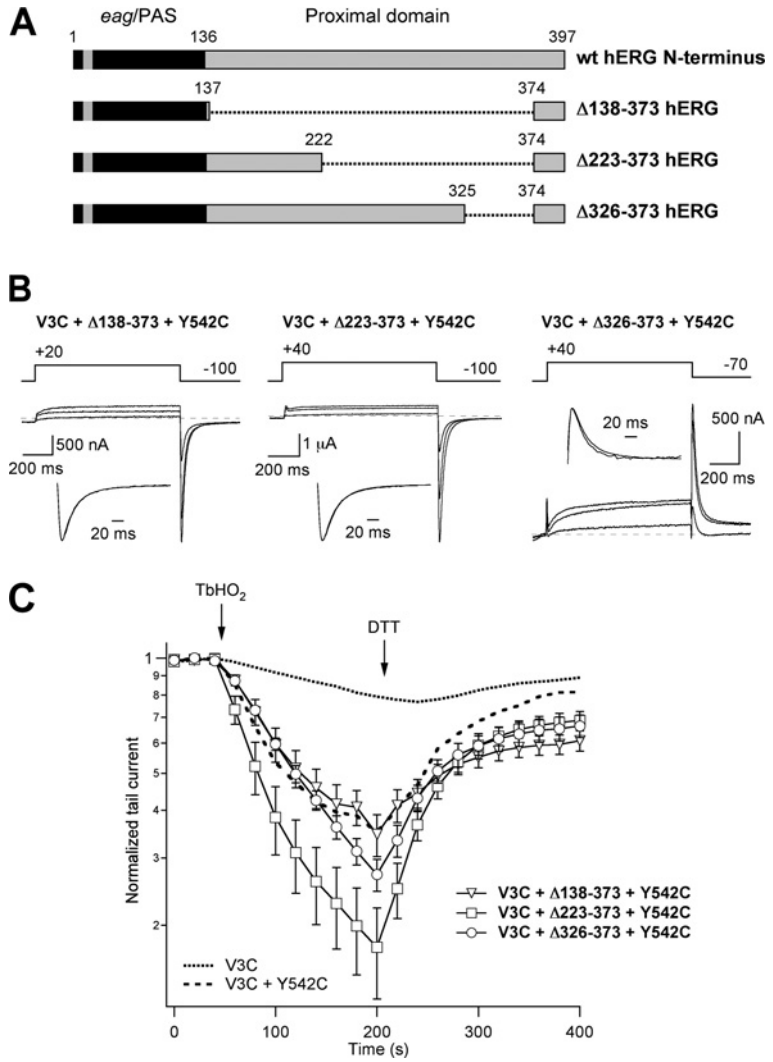


Figure 3 Deletions in the proximal domain of the N-terminus do not block disulfide bridging between cysteine residues 3 and 542

(**A**) Schematic diagram of HERG N-terminus in wild-type and deletion mutants. The regions corresponding to the *eag*/PAS (residues 1–136), the proximal domain up to the first transmembrane helix and the portions corresponding to amino acids 1–12 and 13–23 encompassing the initial flexible tail and the amphipathic helix respectively, are represented in the scheme. Internal deletions are marked as dashed lines. The size of each domain and the length of the deletions are represented proportional to the total length of the N-terminus. (**B**) Effect of the oxidation/reduction treatment on HERG currents from channels carrying different deletions in the proximal domain. The results correspond to HERG channels carrying double cysteine substitutions at residues 3 and 542 (V3C + Y542C) and with proximal domain deletions corresponding to most of the whole domain (Δ138–373), nearly half of it (Δ223–373), or only the sequence 326–373 (Δ326–373). Pulse protocols and superimposed current traces are shown following stabilization of the tail current magnitudes, 2–3 min after application of 2 mM $TbHO_2$ and 5 min after substituting the oxidizing agent with 5 mM DTT. The trace showing the smaller tail current size always corresponds to $TbHO_2$ treatment. Extracellular high-K^+ OR-2 medium containing 50 mM KCl was used to record currents from channels carrying the Δ138–373 and Δ223–373 deletions. Expanded tail current traces normalized to peak before and after adding $TbHO_2$ are shown in the insets. The trace showing a slightly faster rate of decay always corresponds to $TbHO_2$ treatment. (**C**) Time course of peak tail current variation. Tail current magnitudes normalized to the value obtained immediately before $TbHO_2$ addition are shown for V3C + Δ138–373 ($n = 10$), V3C + Δ223–373 + Y542C ($n = 8$) and V3C + Δ326–373 + Y542C ($n = 10$) channel constructs. Data from single V3C (dotted line) and double V3C + Y542C (dashed line) mutant channels without any deletion are also shown for comparison.

The Δ326–373 deletion in the proximal domain allows for the state-dependent formation of a disulfide bridge between Cys^3 and an endogenous cysteine residue

To study further the specificity of the effects of deletions in the proximal domain, we also combined the proximal domain deleted channels with the single point mutation V3C. Consistent with our initial expectations, deletion of approximately half (Δ223–373) or almost all the proximal domain (Δ138–373), did not modify the small and slow effect of $TbHO_2$ on the single cysteine V3C mutant (Figure 4). Surprisingly, the oxidizing agent rapidly and markedly lowered the HERG current level in oocytes expressing a V3C mutant also carrying the short Δ326–373 deletion (V3C + Δ326–373 construct; $60.7 \pm 3.7\,\%$ inhibition, $n = 8$). Since these oxidation effects were largely reversed by DTT, they are not due to DTT-irreversible reactions [13,14] and, since no other cysteine residue has been introduced, it is likely that they are due to formation of a disulfide cross-linkage between Cys^3 and some endogenous cysteine. It is important to emphasize that the gating characteristics exhibited by the V3C + Δ326–373 channels are almost identical to those from channels lacking the whole proximal domain, such as Δ138–373/HERG [24] and V3C + Δ138–373/HERG (Supplementary Figure S1 at http://www.biochemj.org/bj/451/bj4510463add.htm). This argues against the possibility that the results obtained with V3C + Δ326–373 are due to a major disorganization of the protein structure in this construct.

In an attempt to further identify the possible structural determinants involved in the effect observed with the V3C + Δ326–373

© The Authors Journal compilation © 2013 Biochemical Society

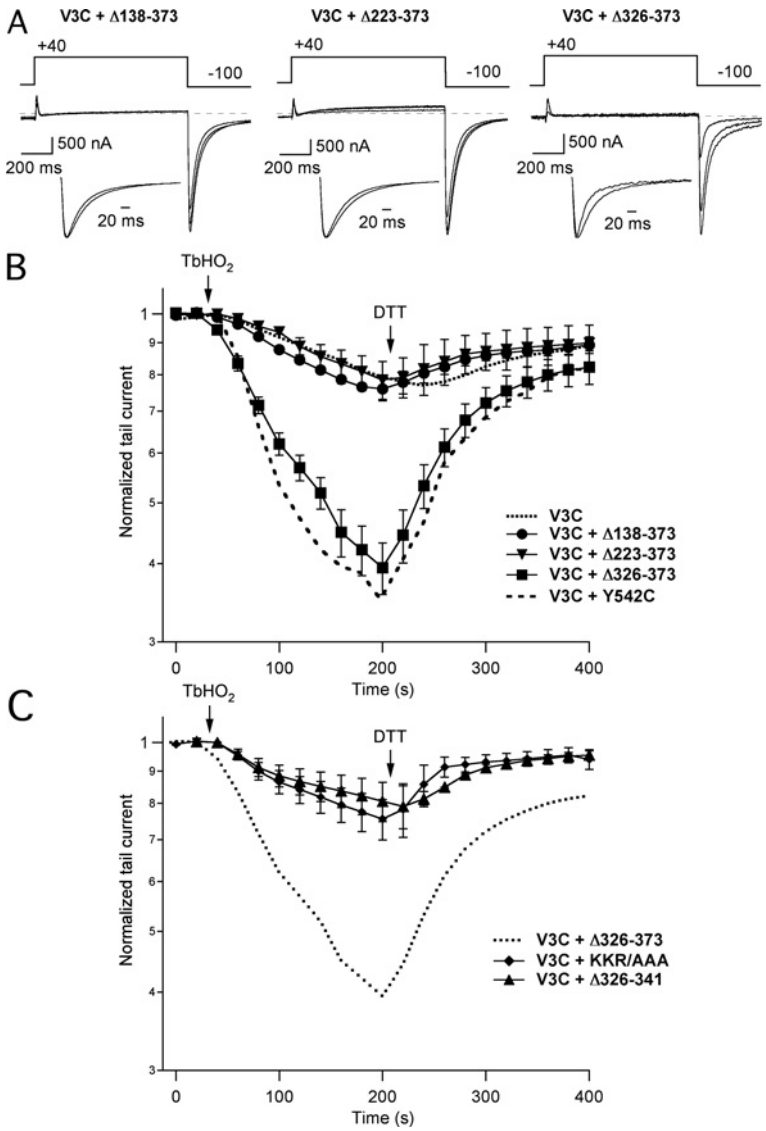


Figure 4 Effects of proximal domain deletions on the oxidation/reduction response of HERG channels carrying a single V3C mutation

(**A**) Effect of the oxidation/reduction treatment on HERG currents from V3C channels carrying the different deletions in the proximal domain. Pulse protocols and superimposed current traces are shown following stabilization of the tail current magnitudes, 2–3 min after application of 2 mM $TbHO_2$ and 5 min after substituting the oxidizing agent with 5 mM DTT. The trace showing the smaller tail current size always corresponds to $TbHO_2$ treatment. Extracellular high-K^+ OR-2 medium containing 50 mM KCl was used to record currents. (**B**) Time course of peak tail current variation in V3C channels lacking most of the whole proximal domain (Δ138–373, $n = 5$), nearly half (Δ223–373, $n = 4$) or only the sequence 326–374 ($n = 8$). Data from single V3C (dotted line) and double V3C + Y542C (dashed line) mutant channels without any deletion are also shown for comparison. Expanded tail current traces normalized to peak before and after adding $TbHO_2$ are shown in the insets. The trace showing a slightly faster rate of decay always corresponds to $TbHO_2$ treatment. (**C**) Time course of peak tail current variation of V3C channels carrying either a triple mutation to alanine of three basic residues at positions 362, 364 and 366 in the KIKER sequence of the proximal domain (V3C + KKR/AAA, $n = 3$), or a short deletion including the 326–332 RYRTISK sequence (Δ326–341, $n = 3$). Data from the V3C + Δ326–373 channels are shown as reference (dotted line).

construct, we combined the cysteine residue at position 3 with the triple mutation KKR/AAA in the KIKER sequence (positions 362–366) (see above). However, unlike the results encountered with the V3C + Δ326–373 channels, the effect of the oxidizing agent was the same as that observed in the single V3C mutant (Figure 4C). Almost identical results were obtained when the V3C mutation was combined with a short deletion between residues 325 and 342 (construct V3C + Δ326–341), such that the KIKER sequence is maintained, but lacks the residues 326–332 including the RYRTISK sequence. As previously reported, this short region includes consensus sequences for phosphorylation by several protein kinases as well as for binding of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and interaction with 14-3-3 proteins, and it can act as a substitute for the KIKER sequence under certain circumstances [24]. Therefore our results from the present study indicate that the data observed upon oxidation of the V3C + Δ326–373 construct are specific for the 326–373 deletion and are not the consequence of confining the structural alterations to the RYRTISK or the KIKER sequences. Thus we concluded that some subtle structural alteration induced by the Δ326–373 deletion causes a reorientation of the Cys^3 side chain allowing for the formation of a disulfide bridge with an endogenous cysteine residue.

Identification of C-linker Cys^{723} as the disulfide cross-link partner of Cys^3 in Δ326–373 channels

There are reports indicating that some residues of the C-linker/cNBD regions of the HERG C-terminus could be involved

© The Authors Journal compilation © 2013 Biochemical Society

in the control of deactivation gating through their interaction with the *eag*/PAS domain [20–22,28]. However, although there are indications that the flexible N-terminal tail of the N-terminus may be orientated towards the surface of the cNBD [20], a direct demonstration of a close proximity and/or interaction between the beginning of the N-terminus and the C-linker/cNBD region is still lacking. Interestingly, there are four endogenous cysteine residues in the HERG C-linker between the pore domain and the more cytoplasmic cNBD sequence (Cys^{723}, Cys^{729}, Cys^{740} and Cys^{750}), and Cys^{723} seems to be critically involved in HERG function alterations caused by oxidative stress in HEK (human embryonic kidney)-293 cells expressing the channel [30]. Therefore we checked the possible implication of these residues in the effects induced by $TbHO_2$ in the Δ326–373 deleted channels. For this purpose, we initially generated two additional V3C mutants carrying the Δ326–373 deletion and either Cys^{723} and Cys^{729} or Cys^{740} and Cys^{750} changed to glycine. We observed that, in channels lacking endogenous Cys^{740} and Cys^{750} (construct V3C + Δ326–373 + C740G + C750G), the extent of the $TbHO_2$-induced inhibition ($46.0 \pm 4.8\,\%$, $n = 3$) was not significantly different to that observed with the V3C + Δ326–373 construct ($P = 0.06$). However, cysteine-to-glycine mutation of residues 723 and 729 (construct V3C + Δ326–373 + C723G + C729G) significantly lowered the effect of the oxidizing agent to $31.3 \pm 3.3\,\%$ ($n = 3$; $P < 0.002$ compared with V3C + Δ326–373). This suggested that, in the Δ326–373 deleted channel, the addition of the oxidizing agent triggers the formation of a disulfide bridge between Cys^3 and one or both of the endogenous cysteine residues in positions 723 and 729. In order to identify which of these endogenous cysteine residues is able to interact with Cys^3, two additional constructs were prepared in which, in the background of the Δ326–373 deletion, V3C was independently combined with C723A or C729A mutations. As shown in Figures 5(A) and 5(B), the oxidation-induced effect of $TbHO_2$ remained largely intact in the V3C + Δ326–373 + C729A construct, but it was abolished in the V3C + Δ326–373 + C723A channel. This identifies Cys^{723} as the C-linker-located residue interacting with Cys^3 in the V3C + Δ326–373 mutant. As discussed below, unless deletion of the 326–373 segment causes a major alteration of the channel architecture, these results also suggest that a close proximity exists between the N-terminal tail and the C-linker structures located at the bottom of S6 in the C-terminus.

State dependence of the oxidation effect in V3C + Δ326–373 channels

One remarkable property of the disulfide chemistry approach is its strict dependence on the spatial proximity between the disulfide-forming pairs of residues. Since the protein regions analysed in the present study are expected to be dynamically modulated during channel function and as a last indication of specificity and strong spatial dependence of the oxidation-induced current reductions, we compared the oxidation effects in mutant channels expressed in cells held at $-80/-100$ and $+40/+60$ mV during the application of $TbHO_2$, therefore maintaining the channels in the closed (C) or the open/inactivated (O/I) state respectively. Analysis of the oxidation effect with the V3C + Δ326–373 channels held at $+40$ mV demonstrated a prominent reduction of the oxidation-induced current inhibition when the channels were maintained in the open/inactivated conformation (Figure 5C). Since in this case the disulfide bond formed under oxidizing conditions should be established between the N-terminal tail of the N-terminus and the C-terminus C-linker region (see above), Figure 5 demonstrates that the relative orientation of these regions is modified during channel excursions from closed to open/inactive conformations. It is interesting to note the extent to which shifting the conformational state of the channel from closed to open/inactive affected the disulfide cross-linking of Cys^3 with the C-linker Cys^{723}. Thus, once the $TbHO_2$-induced basal current inhibition exhibited by the single V3C mutant (21 % at 2–3 min of treatment) is subtracted from the inhibition values exhibited by the other constructs, the $39.7 \pm 3.7\,\%$ net oxidation-induced current inhibition at $-80/-100$ mV in V3C + Δ326–373 drops to $5.0 \pm 2.8\,\%$ when the channels were maintained open/inactivated at $+40/+60$ mV (an 88 % smaller effect in the open/inactive conformation). This strong state dependence showed by the V3C + Δ326–373 channels is even bigger than that previously observed with the V3C + Y542C channels, in which Cys^3 interacts with the S4–S5 loop Cys^{542} [14]. Therefore this suggests that the conformational rearrangements associated with gating may induce quite a long-range movement of Cys^3 with respect to the C-linker-located Cys^{723} in these channels, such that the cysteine residue present in the N-terminal tail interacts with the endogenous Cys^{723} in the closed, but not in the open/inactive, conformation(s).

Characterization of the oxidation effects on double cysteine V3C + Y542C mutant channels carrying the Δ326–373 deletion

As an additional test to prove that deletion of the 326–373 segment directs Cys^3 towards the C-linker, we also analysed the oxidation-induced effect in channels in which the endogenous cysteine residues at the C-linker were changed to alanine residues, but in the background of the double mutant V3C + Y542C. When the channels were held closed, the elimination of Cys^{723} abolished the oxidation effect in V3C + Y542C channels also carrying the Δ326–373 deletion (construct V3C + Δ326–373 + Y542C + C723A). This effect was specific for the C723A mutation, since it was not observed with V3C + Δ326–373 + Y542C + C729A channels in which an alanine residue substituted the endogenous Cys^{729} (Figures 6A and 6B). Thus, even though an engineered cysteine residue is present at position 542 of the S4–S5 linker, the Δ326–373 deletion maintains the location of Cys^3 shifted towards Cys^{723}, further supporting the hypothesis that, at least in the closed conformation of the channel, the initial portion of the N-terminus points towards the C-linker structure in the absence of the 326–373 segment.

Since the above data suggested that the relative location of the N-terminal tail and the C-linker structures may change during channel excursions from closed to open/inactive conformations, we also checked the state dependence of the oxidation effects on the V3C + Δ326–373 + Y542C channel. Surprisingly, we observed that, unlike the situation encountered with the V3C + Δ326–373 construct, the effect exerted by the oxidizing agent on the V3C + Δ326–373 + Y542C construct was the same, both holding it in the closed or the open/inactive conformation at -80 and $+40$ mV respectively (Figure 6C). This effect was specific for the Δ326–373 deletion, because performance of a similar analysis with double cysteine mutants lacking approximately half of the proximal domain (V3C + Δ223–373 + Y542C) or almost the whole proximal domain (V3C + Δ138–373 + Y542C), showed a marked reduction of the $TbHO_2$-induced inhibition of the currents in the open/inactive state (results not shown). Since these results are analogous to those observed with the non-deleted V3C + Y542C channels [14], it seems that the N-terminal tail and the S4–S5 linker preferentially interact

© The Authors Journal compilation © 2013 Biochemical Society

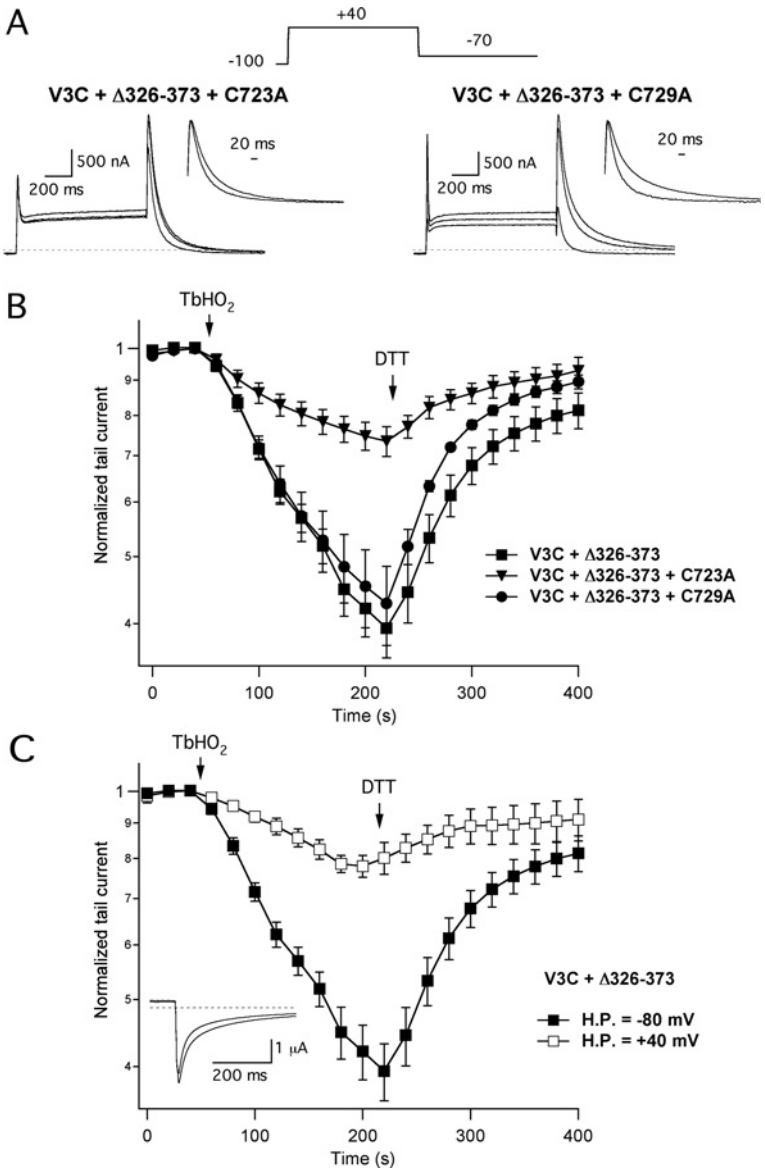


Figure 5 The Cys[3] introduced in Δ326–373 deleted channels forms disulfide bridges with the endogenous Cys[723] in a state-dependent manner

(**A**) $TbHO_2$-induced inhibition of the V3C + Δ326–373 currents is impaired by mutation to alanine of Cys^{723} but not Cys^{729}. Current traces were recorded in response to the indicated pulse protocol following stabilization of the tail current magnitudes, 2–3 min after application of 2 mM $TbHO_2$ and 5 min after substituting the oxidizing agent with 5 mM DTT. The trace showing the smaller tail current size always corresponds to $TbHO_2$ treatment. (**B**) Time course of oxidation-induced attenuation of currents corresponding to V3C channels carrying the Δ326–373 deletion and the point mutations C723A or C729A. Data from V3C + Δ326–373 channels without any additional mutation in the C-linker cysteine residues are also shown for comparison. Expanded tail current traces normalized to peak before and after adding $TbHO_2$ are shown in the insets. The trace showing a faster rate of decay always corresponds to $TbHO_2$ treatment. (**C**) State dependence of the oxidation effects on V3C + Δ326–373 channels. The time course of peak tail current variation was compared in channels held closed at − 80 (closed symbols) or open/inactivated at + 40 mV (open symbols). H.P., holding potential. Two representative current traces obtained before and after application of $TbHO_2$ to an oocyte held at + 40 mV are shown in the inset. The tail inward currents in this cell were recorded in standard OR-2 medium during a brief repolarization to − 120 mV. The trace showing the smaller tail current size corresponds to $TbHO_2$ treatment.

in the closed state, regardless of the presence or absence of the proximal domain. On the other hand, the behaviour of the V3C + Δ326–373 + Y542C construct raises the question about which amino acid was the partner of Cys^3 when the V3C + Δ326–373 + Y542C channels were oxidized in the open/inactivated state. In principle, we envisioned two alternative possibilities: that, as a result of the conformational rearrangements induced by the closed–open/inactivated transition(s), Cys^3 pointed again towards Cys^{542} in the S4–S5 linker, or that it remained positioned towards an endogenous cysteine residue such as Cys^{723}. Subsequently, we analysed the oxidation effects when the V3C + Δ326–373 + C723A and V3C + Δ326–373 + Y542C + C723A channels were maintained in the open/inactivated state. We observed that, in both cases, the C723A mutation prevented the oxidation-induced inhibition of the current magnitude. Thus the extent of the $TbHO_2$-induced inhibition amounted to $8.8 \pm 3.8\,\%$ ($n = 4$) with the V3C + Δ326–373 + C723A and $10.2 \pm 1.5\,\%$ ($n = 5$) with the V3C + Δ326–373 + Y542C + C723A constructs held at + 40 mV. These results demonstrate that the presence of Cys^{542} in the S4–S5 linker of the Δ326–373 channels is not enough for the oxidation effects to take place in the absence of Cys^{723}, indicating that disulfide bridging does not take place between Cys^3 and Cys^{542} in the open/inactivated conformation of these

© The Authors Journal compilation © 2013 Biochemical Society

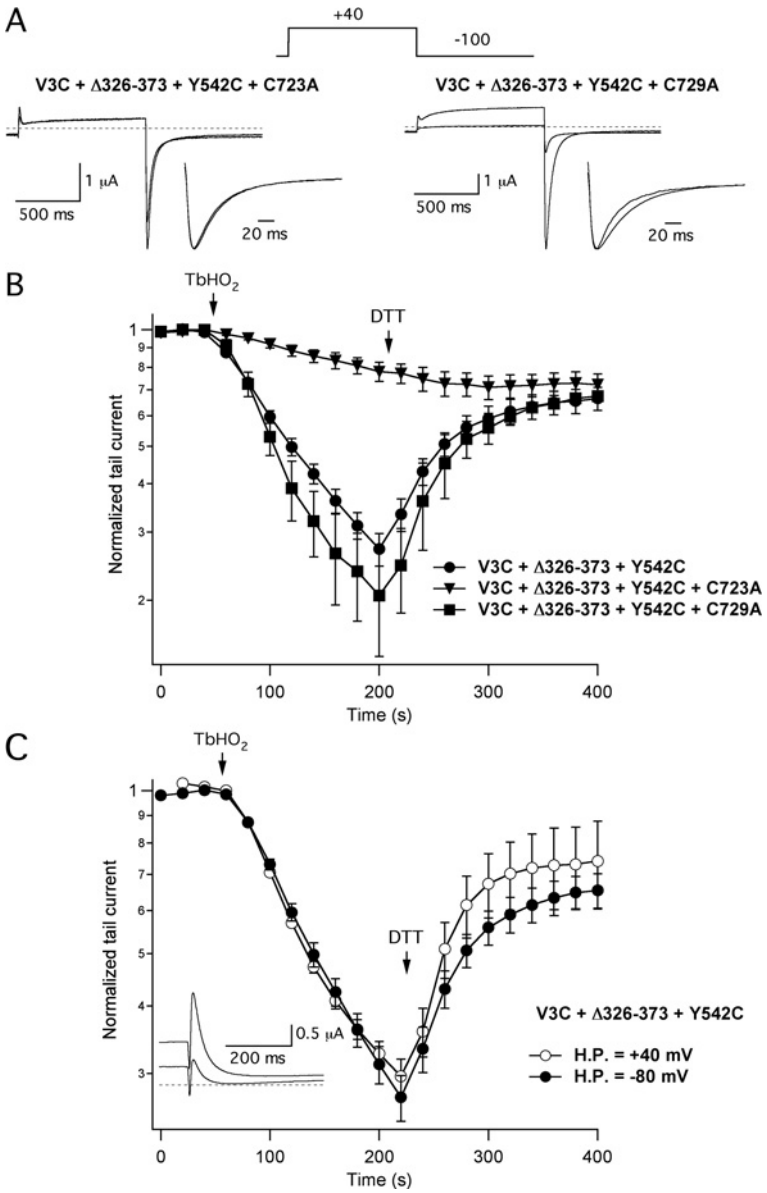


Figure 6 Characterization of the oxidation-induced effects on double cysteine V3C + Y542C channels also carrying a Δ326–373 deletion

(**A**) $TbHO_2$-induced inhibition of the V3C + Δ326–373 + Y542C currents is impaired by mutation to alanine of Cys^{723} but not Cys^{729}. Current traces were recorded in response to the indicated pulse protocol before and 2–3 min after application of 2 mM $TbHO_2$. The trace showing the smaller tail current size always corresponds to $TbHO_2$ treatment. Extracellular high-K^+ OR-2 medium containing 50 mM KCl was used to record currents. (**B**) Time course of oxidation-induced attenuation of currents from V3C + Y542C channels carrying an additional Δ326–373 deletion and point mutations C723A or C729A. (**C**) State dependence of the oxidation effects on V3C + Δ326–373 + Y542C channels. The time course of peak tail current variation was compared with channels held closed at − 80 (closed symbols) and open/inactivated at + 40 mV (open symbols). H.P., for holding potential. Two representative current traces obtained before and after application of 2 mM $TbHO_2$ to an oocyte held at + 40 mV are shown in the inset. The tail inward currents in this cell were recorded in standard OR-2 medium during a brief repolarization to − 70 mV. The trace showing the smaller tail current size corresponds to $TbHO_2$ treatment. Expanded tail current traces normalized to peak before and after adding $TbHO_2$ are shown in the insets. The trace showing a faster rate of decay always corresponds to $TbHO_2$ treatment.

channels. On the other hand, they suggest that Cys^3 also remains located in proximity to Cys^{723} after the closed–open/inactivated transition of the Δ326–373 channels has been achieved.

DISCUSSION

In the present study we have analysed the role of the *eag*/PAS and proximal domains located in the cytoplasmic N-terminus of HERG channels in controlling the access of the flexible tail of the N-terminus to its binding site(s) in the channel core for interaction with the gating machinery. As for other voltage-gated potassium channels, there is a general agreement that voltage-dependent opening and closing (activation and deactivation gating) of HERG is achieved by a pivoted bending of the lower portion of the S6 helices that opens or closes an intracellular gate, in response to the outward movement of the voltage sensor S4 helices, subsequently translated via the S4–S5 loop to the motion of the interacting S4–S5 linker and lower S6 regions (reviewed in [1,15,19]). In addition, there are numerous reports indicating that the distinctive gating properties of HERG are strongly influenced by some of the cytoplasmic protein domains, and it has been

© The Authors Journal compilation © 2013 Biochemical Society

proposed that interactions of the N-terminal-most region with the S4–S5 linker constitute a crucial modulator of channel gating transitions [1,14,19]. Nevertheless, there are details about the precise mechanism for the N-terminal regulation of HERG gating that are still controversial. Thus there is evidence that not only the N-terminal, but also the C-terminal, region of the channel can modulate the transition between open and closed states, and that this modulation could be achieved either by direct or by indirect/allosteric interactions with the gating machinery, probably at the level of the S4–S5 loop [1,19]. The demonstration that a disulfide cross-linkage is formed between cysteine residues introduced in the distal N-terminal tail of the *eag*/PAS domain and in the S4–S5 linker has provided strong evidence that both regions are in close proximity when the channels are in the closed conformation [14]. However, it has also been proposed that the N-terminal tail is orientated towards the bottom surface of the C-terminal cNBD [20], and that this orientation would prohibit its interaction with the S4–S5 linker [13].

The results of the present study regarding the analysis of the structural requirements of the interaction between the distal N-terminal tail and the channel core indicate that an intact *eag*/PAS domain is necessary for the interaction between the pair of cysteine residues introduced at positions 3 and 542 of the N-terminal tail and the S4–S5 linker respectively, whereas the presence of the exclusive and long HERG proximal domain is dispensable. Also, the fact that a disulfide bridge is formed between the engineered Cys^{3} and the endogenous Cys^{723} suggests that the N-terminal tail of HERG can get into close proximity to the C-linker structures located at the bottom of helix S6. It could be argued that these data could be owing to a major disruption of the channel architecture caused by deletion of the 326–373 segment, but several lines of evidence indicate that this is not the case, and that the results obtained with the V3C + Δ326–373 construct reflect a limited and specific readjustment of the Cys^{3} position, allowing for its directional interaction with the endogenous Cys^{723}. Thus: (i) the V3C + Δ326–373 channel functions normally, arguing against a major disorganization of the protein structure; (ii) the effect is specific for the Δ326–373 deletion, since channels with much longer deletions (e.g. V3C + Δ223–373 and V3C + Δ138–373), expected to cause more drastic disruptions of the channel architecture, do not respond in the same way; (iii) the oxidation effect in the V3C + Δ326–373 channel is state-dependent, indicating that the formation of the disulfide bridge between Cys^{3} and the endogenous C-linker Cys^{723} is affected by subtle conformational reorganizations associated with gating; (iv) a specific and functional interaction between the initial portion of the HERG N-terminus and the gating machinery has been demonstrated using several N-terminal recombinant fragments [18,31,32], suggesting that the correct orientation and subsequent interaction between the N-terminal tail and the gating machinery is not totally determined by the overall organization of other cytoplasmic protein structures; and (v) the oxidation effects in channels carrying the pair of engineered cysteine residues in residues 3 and 542 are also similar with or without the Δ326–373, Δ223–373 and Δ138–373 deletions. This also argues against the possibility that in the case of the V3C + Δ223–373 and the V3C + Δ138–373 channels, the interaction is lost due to a disorganization of the channel architecture, unlike the situation in the V3C + Δ326–373 construct.

An important implication of the above results is that, since the establishment of some disulfide bridges is state-dependent, they have to be formed between protein regions exhibiting changes in their relative positioning due to dynamic reorganizations associated with channel gating. This fact has previously been documented for the interaction between the distal N-terminal tail and the S4–S5 linker in channels carrying the engineered cysteine residues in residues 3 and 542 [14]. Thus, during the transition closed–open/inactivated of the channel, the N-terminal tail seems to move away from the proximity of the N-terminal portion of the S4–S5 linker to a more distant location. This is further supported by the results of the present study, also indicating that: (i) such an interaction requires the presence of the protein segment corresponding to the *eag*/PAS domain; and (ii) although this interaction is not strictly dependent on the presence of the proximal domain, a particular alteration in this long domain influences the normal relative positioning between the N-terminal tail and the C-linker, making them come closer in the functional channel. Noticeably, detection of a disulfide bridge leading to a marked current inhibition ensures that a close proximity can be established between the protein regions carrying the pair of cysteine residues. However, a rigorous translation of the results of the present study to real distances could be meaningless due to the flexible and/or unstructured nature of these regions and their dynamic modulation during channel function, since the probability of collision between the cysteine pairs forming disulfide bonds can be greatly increased by fluctuations of otherwise flexible structures and therefore not necessarily reflect the extent to which these regions are close to each other in the channel [13,33–36]. In fact, the distal N-terminal tail constitutes a highly flexible and/or unstructured region [16,17,20,28], and quite large conformational changes in the C-linker region of some channels going from the resting to the activated configurations have also been proposed [37–39]. It has also been suggested that channels containing a C-linker/cNBD region homologous with that of HERG, such as CNG (cyclic nucleotide-gated), HCN2 and ELK (*eag*-like) channels, may shift from an unliganded/closed conformation as a pair of dimers to a tetrameric and symmetric assembly of interacting C-linker domains, following binding of activating nucleotides to the cNBD that drives the channel to its open conformation [40–42]. On the other hand, it has been demonstrated that the S4–S5 linker of HERG is highly flexible and that maintenance of this flexibility is important for channel gating [43]. In any case, our results indicate that the distal N-terminal tail can aquire a position that allows it to establish disulfide bridges with the C-terminal C-linker structures of HERG, although the relative distance between them may vary in the closed and open conformations. This state dependence also makes it possible that, unlike previously suggested [15], the initial portion of the N-terminus gets close to both the S4–S5 linker and some relatively distant surface(s) of the C-linker/cNBD domain, depending on the conformational reorganizations in which these domains are involved. Thus we propose that the flexible N-tail dynamically changes its position and/or orientation for long enough so as to be able to interact with the S4–S5 linker, the C-linker, and perhaps even with more cytoplasmic cNBD surfaces [20]. Additional support for this proposal is provided, although indirectly, by placing the ensemble of 20 HERG *eag*/PAS structures obtained by NMR ([16,17,20], PDB codes 2L4R, 2L0W and 2L1M) against the C-linker/cNBD crystal structure of HCN2 ([44], PDB code 1Q5O) following the orientation suggested by Muskett et al. [20]. Such preliminary docking suggests that the flexible position of the N-terminal tail can indeed allow it to extend from the bottom surface of the cNBD up to a S4–S5 linker located in a HERG transmembrane core structure homologous to that of Kv1.2 ([11], PDB code 2A79) placed on top of the C-linker/cNBD (results not shown).

A caveat to consider is that the site-directed cysteine and disulfide chemistry approach makes it necessary to introduce cysteine mutations in the putatively interacting positions. This may bring on some alterations in the normal positioning and/or relationship between them, as shown by the fact that all

© The Authors Journal compilation © 2013 Biochemical Society

mutants in the N-terminal tail and/or the S4–S5 loop show an accelerated deactivation behaviour in a basically non-additive way ([14,18,22], Supplementary Table S1 at http://www.biochemj.org/bj/451/bj4510463add.htm). Therefore there are at least two circumstances that could antagonistically influence the extent and time course of the oxidation effects and their subsequent extrapolation to the situation in the native channel: (i) a disruption of the normal positioning and/or interaction between the N-terminal tail and the S4–S5 loop and C-linker structures, that could separate them to a certain distance limiting their optimal interaction; and (ii) the fact that, since some cysteine residues are located in a flexible and/or unstructured region such as the N-tail, random fluctuations of this domain may sporadically bring cysteine pairs usually not very close into enough proximity as to allow for disulfide bridge formation and irreversible decay of current densities until DTT is added. Note, however, that flexibility of the N-terminal tail does not seem to be the only explanation for the results of the present study and that a close juxtaposition of this domain to its putative interacting partners is also required, since some striking differences in the extent of the oxidation effects are caused by varying the position of the cysteine residues to adjacent places (e.g. between P2C and V3C or between Y542C and G546C [14] and from Cys^{723} to Cys^{729} in the present study), even though in all these cases a similar flexibility of the N-terminal tail is expected.

What trajectory does the N-terminus follow upon channel opening and closing? In this context our results with the C723A mutants appear interesting since: (i) the HERG N-terminal tail has been repeatedly proposed as crucial for maintenance of the slow HERG deactivation due to its interaction (presumably in the open state) with other still undetermined site(s) in the channel [17,20,45]; (ii) previous docking methods led to the suggestion that the N-terminal tail may interact with the cNBD region to modulate channel closing [20]; and (iii) the disulfide bridge partner of Cys^3 seems to shift from the S4–S5 linker of the closed V3C + Y542C channels to the C-linker region of the constructs containing the relatively small Δ326–373 deletion. Since our data indicate that Cys^{723} in the C-linker is not far away from the amino end, at least in the V3C + Δ326–373 background, this endogenous cysteine residue constitutes an initial candidate to establish a disulfide bond with the N-terminal tail in some conformational state(s). Further work would be necessary to identify other possible partners with which the N-terminal tail may dynamically interact with during the gating transitions in the native HERG channels. However, it is tempting to speculate that the N-terminal portion may dynamically oscillate between the S4–S5 linker and the C-linker and/or the cNBD regions as a result of the closed–open/inactivated transition.

The model proposed in the present study helps to explain why maintenance of an intact PAS domain structure is necessary for the correct interaction of the first segment of the N-terminus and the gating machinery. Even though the soluble N-terminal domain can act as an independent functional domain able to restore the normal deactivation properties of channels carrying structural alterations in the N-terminus [18,21,31,32,46], under native conditions it is covalently attached to the PAS domain that, interacting with the remainder of the channel, seems to properly place and orientate the distal N-terminal tail, thereby regulating the kinetics of channel opening and closing [17,19,20]. This would also be coherent with our previous proposal that the interaction between the N-terminal tail and the S4–S5 linker forms part of a more global and, perhaps more importantly, dynamic network of interactions also involving the PAS and proximal domains of the N-terminus, the C-terminal portion of helix 6, and the C-terminal C-linker and cNBD domains [14,18].

Previous compilations of HERG mutations linked to LQT2 identified nearly 500 alterations located all along the channel sequence ([47]; see also the Inherited Arrhythmias Database at http://www.fsm.it/cardmoc). However, although many of them are located in the cytoplasmic regions of the channel, only a reduced percentage of these have been characterized by electrophysiological and/or functional analysis. Interestingly, there are more than 40 *eag*/PAS domain mutations that have been linked to LQT2, some of them able to disrupt the interaction of this domain with the rest of the channel [15]. Whether any of the tens of mutations located in the C-linker/cNBD may cause similar effects remains to be established. Also, a mutation in the S4–S5 linker of Kv1.1 that would disrupt the interactions between this linker and the C-terminal region of S6 seems to underlie a neurological disorder, episodic ataxia type I [48]. This illustrates the invaluable insight provided by understanding the cytoplasmic domains–core channel interactions better, not only into the fundamentals of channel function, but also to understand the basis of certain diseases linked to mutations that alter gating characteristics of HERG and other voltage-gated potassium channels.

AUTHOR CONTRIBUTION

Pilar de la Peña and Francisco Barros designed the research, performed the experiments and analysed the data. Angeles Machin and Jorge Fernández-Trillo collaborated with some experiments. Pilar de la Peña, Pedro Domínguez and Francisco Barros wrote the paper.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Teresa González for her technical contribution and Dr Kevin Dalton for proofreading the paper prior to submission.

FUNDING

This work was supported by the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) [grant number BFU2009-11262] and a Consolider-Ingenio project (SICI) [grant number CDS2008-00005].

REFERENCES

1 Barros, F., Domínguez, P. and de la Peña, P. (2012) Cytoplasmic domains and voltage-dependent potassium channel gating. Front. Pharmacol. **3**, 49
2 Sanguinetti, M. C., Jiang, C., Curran, M. E. and Keating, M. T. (1995) A mechanistic link between an inherited and an adquired cardiac arrhythmia. Cell **81**, 299–307
3 Trudeau, M. C., Warmke, J. W., Ganetzky, B. and Robertson, G. A. (1995) HERG, a human inward rectifier in the voltage-gated potassium channel family. Science **269**, 92–95
4 Viskin, S. (1999) Long QT syndromes and torsade de pointes. Lancet **354**, 1625–1633
5 Chiang, C. and Roden, D. M. (2000) The long QT syndromes: genetic basis and clinical implications. J. Am. Coll. Cardiol. **36**, 1–12
6 Keating, M. T. and Sanguinetti, M. C. (2001) Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias. Cell **104**, 569–580
7 Finlayson, K., Witchel, H. J., McCulloch, J. and Sharkey, J. (2004) Adquired QT interval prolongation and HERG: implications for drug discovery and development. Eur. J. Pharmacol. **500**, 129–142
8 Roden, D. M., Lazzara, R., Rosen, M., Schwartz, P. J., Towbin, J. and Vincent, G. M. (1996) Multiple mechanisms in the long-QT syndrome. Current knowledge, gaps, and future directions. Circulation **94**, 1996–2012
9 Schwartz, P. J. (2005) Management of the long QT syndrome. Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med. **2**, 346–351
10 Jian, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B. T. and MacKinnon, R. (2003) X-ray structure of a voltage-dependent K^+ channel. Nature **423**, 33–41
11 Long, S. B., Campbell, E. B. and MacKinnon, R. (2005) Crystal structure of a mammalian voltage-dependent *Shaker* family K^+ channel. Science **309**, 897–902
12 Long, S. B., Tao, X., Campbell, E. B. and MacKinnon, R. (2007) Atomic structure of a voltage-dependent K^+ channel in a lipid membrane-like environment. Nature **450**, 376–382

© The Authors Journal compilation © 2013 Biochemical Society

13 Bass, R. B., Butler, S. L., Chervitz, S. A., Gloor, S. L. and Falke, J. J. (2007) Use of site-directed cysteine and disulfide chemistry to probe protein structure and dynamics: applications to soluble and transmembrane receptors of bacterial chemotaxis. Meth. Enzymol. **423**, 25–51
14 de la Peña, P., Alonso-Ron, C., Machín, A., Fernández-Trillo, J., Carretero, L., Domínguez, P. and Barros, F. (2011) Demonstration of physical proximity between the amino terminus and the S4-S5 linker of the hERG potassium channel. J. Biol. Chem. **286**, 19065–19075
15 Gustina, A. S. and Trudeau, M. C. (2012) HERG potassium channel regulation by the N-terminal eag domain. Cell. Signalling **24**, 1592–1598
16 Li, Q., Gayen, S., Chen, A. S., Huang, Q., Raida, M. and Kang, C. (2010) NMR solution structure of the N-terminal domain of hERG and its interaction with the S4-S5 linker. Biochem. Biophys. Res. Commun. **403**, 126–132
17 Ng, C. A., Hunter, M. J., Perry, M. D., Mobli, M., Ke, Y., Kuchel, P. W., King, G. F., Stock, D. and Vandenberg, J. I. (2011) The N-terminal tail of hERG contains an amphipathic α-helix that regulates channel deactivation. PLoS ONE **6**, e16191
18 Fernández-Trillo, J., Barros, F., Machín, A., Carretero, L., Domínguez, P. and de la Peña, P. (2011) Molecular determinants of interactions between the N-terminal domain and the transmembrane core that modulate hERG K^+ channel gating. PLoS ONE **6**, e24674
19 Cheng, Y. M. and Claydon, T. W. (2012) Voltage-dependent gating of hERG potassium channels. Front. Pharmacol. **3**, 83
20 Muskett, F. W., Thouta, S., Thomson, S. J., Bowen, A., Stansfeld, P. J. and Mitcheson, J. S. (2011) Mechanistic insight into hERG K^+ channel deactivation gating from the solution structure of the eag domain. J. Biol. Chem. **286**, 6184–6191
21 Gustina, A. S. and Trudeau, M. C. (2011) hERG potassium channel gating is mediated by N- and C-terminal region interactions. J. Gen. Physiol. **137**, 315–325
22 Al-Owais, M., Bracey, K. and Wray, D. (2009) Role of intracellular domains in the function of the hERG potassium channel. Eur. Biophys. J. **38**, 569–576
23 Alonso-Ron, C., de la Peña, P., Miranda, P., Domínguez, P. and Barros, F. (2008) Thermodynamic and kinetic properties of amino-terminal and S4-S5 loop HERG channel mutants under steady-state conditions. Biophys. J. **94**, 3893–3911
24 Alonso-Ron, C., Barros, F., Manso, D. G., Gómez-Varela, D., Miranda, P., Carretero, L., Domínguez, P. and de la Peña, P. (2009) Participation of HERG channel cytoplasmic structures on regulation by the G protein-coupled TRH receptor. Pflügers Arch. **457**, 1237–1252
25 Viloria, C. G., Barros, F., Giráldez, T., Gómez-Varela, D. and de la Peña, P. (2000) Differential effects of amino-terminal distal and proximal domains in the regulation of human erg K^+ channel gating. Biophys. J. **79**, 231–246
26 Gómez-Varela, D., de la Peña, P., García, J., Giráldez, T. and Barros, F. (2002) Influence of amino-terminal structures on kinetic transitions between several closed and open states in human erg K^+ channels. J. Membr. Biol. **187**, 117–133
27 Gómez-Varela, D., Barros, F., Viloria, C. G., Giráldez, T., Manso, D. G., Dupuy, S. G., Miranda, P. and de la Peña, P. (2003) Relevance of the proximal domain in the amino-terminus of HERG channels for regulation by a phospholipase C-coupled hormone receptor. FEBS Lett. **535**, 125–130
28 Morais-Cabral, J. H., Lee, A., Cohen, S. L., Chait, B. T., Li, M. and MacKinnon, R. (1998) Crystal structure and functional analysis of the HERG potassium channel N terminus: a eukaryotic PAS domain. Cell **95**, 649–655
29 Saenen, J. B., Labro, A. J., Raes, A. and Snyders, D. J. (2006) Modulation of HERG gating by a charge cluster in the N-terminal proximal domain. Biophys. J. **91**, 4381–4391
30 Kolbe, K., Schönherr, R., Gessner, G., Sahoo, N., Hoshi, T. and Heinemann, S. H. (2010) Cysteine 723 in the C-linker segment confers oxidative inhibition of hERG1 potassium channels. J. Physiol. **588**, 2999–3009
31 Wang, J., Myers, C. D. and Robertson, G. A. (2000) Dynamic control of deactivation gating by a soluble amino-terminal domain in HERG K^+ channels. Biophys. J. **115**, 749–758
32 Gustina, A. S. and Trudeau, M. C. (2009) A recombinant N-terminal domain fully restores deactivation gating in N-truncated and long QT syndrome mutant hERG potassium channels. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **106**, 13082–13087
33 Ferrer, T., Rupp, J., Piper, D. R. and Tristani-Firouzi, M. (2006) The S4-S5 linker directly couples voltage sensor movement to the activation gate in the human ether-a-go-go-related gene (hERG) K^+ channel. J. Biol. Chem. **281**, 12858–12864
34 Liu, J., Zhang, M., Jiang, M. and Tseng, G-N. (2002) Structural and functional role of the extracellular S5-P linker in the HERG potassium channel. J. Gen. Physiol. **120**, 723–737
35 Brown, S., Sonntag, D. P. and Sanguinetti, M. C. (2008) A highly conserved alanine in the S6 domain of the hERG1 K^+ channel is required for normal gating. Cell. Physiol. Biochem. **22**, 601–610
36 Bell, D. C., Turbendian, H. K., Valley, M. T., Zhou, L., Riley, J. H., Siegelbaum, S. A. and Tibbs, G. R. (2009) Probing S4 and S5 segment proximity in mammalian hyperpolarization-activated HCN channels by disulfide bridging and Cd^{2+} coordination. Pflügers Arch. **458**, 259–272
37 Craven, K. B. and Zagotta, W. N. (2004) Salt bridges and gating in the COOH-terminal region of HCN2 and CNGA1 channels. J. Gen. Physiol. **124**, 663–677
38 Hua, L. and Gordon, S. E. (2005) Functional interactions between A' helices in the C-linker of open CNG channels. J. Gen. Physiol. **125**, 335–344
39 Taraska, J. W. and Zagotta, W. N. (2007) Structural dynamics in the gating ring of cyclic nucleotide-gated ion channels. Nat. Struct. Mol. Biol. **14**, 854–860
40 Higgins, M. K., Weitz, D., Warne, T., Schertler, G. F. X. and Kaupp, U. B. (2002) Molecular architecture of a retinal cGMP-gated channel: the arrangement of the cytoplasmic domains. EMBO J. **21**, 2087–2094
41 Ulens, C. and Siegelbaum, S. A. (2003) Regulation of hyperpolarization-activated HCN channels by cAMP through a gating switch in binding domain symmetry. Neuron **40**, 959–970
42 Brelidze, T. I., Carlson, A. E., Sankaran, B. and Zagotta, W. N. (2012) Structure of the carboxy-terminal region of a KCNH channel. Nature **481**, 530–533
43 Van Slyke, A. C., Rezazadeh, S., Snopkowski, M., Shi, P., Allard, C. R. and Claydon, T. W. (2010) Mutations within the S4-S5 linker alter voltage sensor constraints in hERG K^+ channels. Biophys. J. **99**, 2841–2852
44 Zagotta, W. N., Olivier, N. B., Black, K. D., Young, E. C., Olson, R. and Gouaux, E. (2003) Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels. Nature **425**, 200–205
45 Tan, P. S., Perry, M. D., Ng, C. A., Vandenberg, J. I. and Hill, A. P. (2012) Voltage-sensing domain mode shift is coupled to the activation gate by the N-terminal tail of hERG channels. J. Gen. Physiol. **140**, 293–306
46 Gianulis, E. C. and Trudeau, M. C. (2011) Rescue of aberrant gating by a genetically encoded PAS (Per-Arnt-Sim) domain in several long QT syndrome mutant human *ether-a-go-go*-related gene potassium channels. J. Biol. Chem. **286**, 22160–22169
47 Zhang, T., Moss, A., Cong, P., Pan, M., Chang, B., Zheng, L., Fang, Q., Zareba, W., Robinson, J., Lin, C. et al. (2010) LQTS gene LOVD database. Hum. Mut. **31**, E1801–E1810
48 Batulan, Z., Haddad, G. A. and Blunck, R. (2010) An intersubunit interaction between S4-S5 linker and S6 is responsible for the slow off-gating component in Shaker K^+ channels. J. Biol. Chem. **285**, 14005–14019

Received 13 November 2012/29 January 2013; accepted 18 February 2013
Published as BJ Immediate Publication 18 February 2013, doi:10.1042/BJ20121717

© The Authors Journal compilation © 2013 Biochemical Society

Biochem. J. (2013) **451**, 463–474 (Printed in Great Britain) doi:10.1042/BJ20121717

online data

SUPPLEMENTARY ONLINE DATA

Mapping of interactions between the N- and C-termini and the channel core in HERG K^+ channels

Pilar DE LA PEÑA[1], Angeles MACHÍN, Jorge FERNÁNDEZ-TRILLO, Pedro DOMÍNGUEZ and Francisco BARROS[1]

Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Oviedo, 33006 Oviedo, Spain

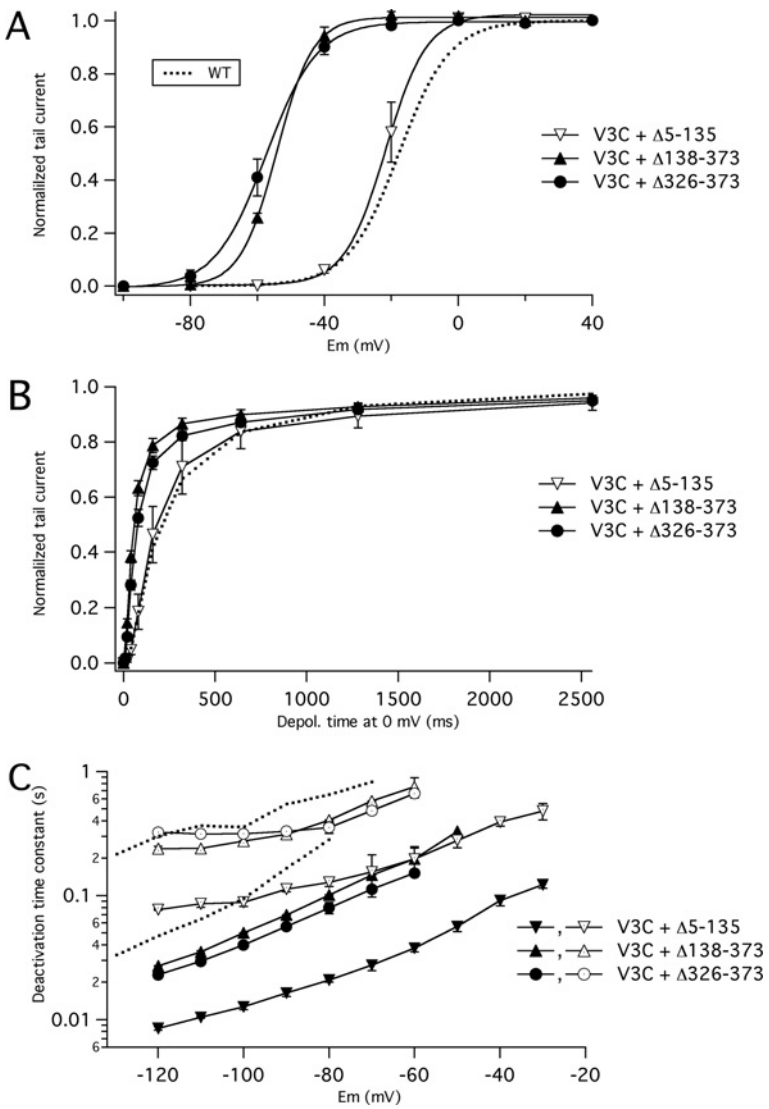


Figure S1 Comparison of activation and deactivation kinetics of V3C mutant channels carrying deletions in the *eag*/PAS and the proximal domain

(**A**) Fractional activation curves were obtained from tail current data after 1 s depolarizations between -100 and $+40$ mV in 20 mV increments. The continuous lines correspond to Boltzmann curves $h\,(V) = I_{max}\,\{1/[1 + \exp(V - V_{0.5})/k)]\}$, which best fitted the data. A Boltzmann curve obtained from oocytes expressing wild-type (WT) channels is also included as a reference (dotted line). (**B**) Comparison of activation rates at 0 mV. The activation time course was studied by an envelope-of-tails protocol varying the duration of a depolarization prepulse to 0 mV and measuring the magnitude of the tail current peak at the end of every conditioning prepulse. A data trace obtained from oocytes expressing wild-type (WT) channels is also included as a reference (dotted line). (**C**) Dependence of deactivation rates on repolarization membrane potential. Deactivation time constants were quantified by fitting a double exponential to the decaying portion of tail currents using a function of the form $y = A_f \exp(-\mathrm{inv}\tau_f \cdot x) + A_s \exp(-\mathrm{inv}\tau_s \cdot x) + C$, where τ_f and τ_s are the time constants of fast and slow components, A_f and A_s are the relative amplitudes of these components, and C is a constant. In all cases, the first cursor of the fitting window was advanced to the end of the initial hook due to the recovery of inactivation. The magnitude of the deactivation time constants corresponding to the fast decaying current major component at negative voltages (closed symbols) and to the slow deactivating component (open symbols) are shown. Data from oocytes expressing wild-type (WT) channels are also included as reference (dotted lines).

[1] Correspondence may be addressed to either of these authors (email pdelapena@uniovi.es or fbarros@uniovi.es).

© The Authors Journal compilation © 2013 Biochemical Society

Table S1 Comparison of deactivation parameters for all constructs in the absence and the presence of the oxidizing agent $TbHO_2$

Deactivation time constants were determined from negative-amplitude biexponential fits to the decaying phase of the tail currents upon membrane depolarization, following the pulse protocols illustrated in Figures 2–6 of the main text, and using the function $y = A_f \exp(-T/\tau_f) + A_s \exp(-T/\tau_s) + C$, in which T is the time, τ_f and τ_s are the time constants of fast and slow components, A_f and A_s are the relative amplitudes of these components and C is a constant. For simplicity, only the values of the deactivation time constants corresponding to the fast decaying current major component at negative voltages are shown.

	Fast deactivation time constant (ms)		
Construct	Control	+ $TbHO_2$	*n*
V3C + Δ5–135	19 ± 5	18 ± 5	4
V3C + Δ5–135 + Y542C	36 ± 2	34 ± 4	5
V3C + Δ10–23 + Y542C	17 ± 2	14 ± 3	5
V3C + Δ138–373 + Y542C	27 ± 2	26 ± 2	12
V3C + Δ223–373 + Y542C	32 ± 3	28 ± 2	12
V3C + Δ326–373 + Y542C*	35 ± 3	31 ± 2	11
V3C + Δ138–373	68 ± 9	63 ± 13	7
V3C + Δ223–373	54 ± 4	44 ± 4	4
V3C + Δ326–373	67 ± 9	46 ± 11	8
V3C + KKR/AAA	78 ± 4	50 ± 3†	4
V3C + Δ326–341	89 ± 11	53 ± 5†	5
V3C + Δ326–373 + C723A*	52 ± 3	37 ± 5†	4
V3C + Δ326–373 + C729A*	57 ± 3	37 ± 3†	4
V3C + Δ326–373 + Y542C + C723A	53 ± 7	52 ± 8	10
V3C + Δ326–373 + Y542C + C729A	38 ± 3	26 ± 2†	10
Wild-type	145 ± 14	144 ± 7	9

*Measured in 2 mM extracellular potassium at − 70 mV.
†$P < 0.05$ compared with control.

Received 13 November 2012/29 January 2013; accepted 18 February 2013
Published as BJ Immediate Publication 18 February 2013, doi:10.1042/BJ20121717

© The Authors Journal compilation © 2013 Biochemical Society