



Universidad de Oviedo

Programa de doctorado Biología Funcional y Molecular

**Rutas de transducción de señales y procesos de fosforilación  
implicados en la regulación de canales *erg* por TRH**

Tesis Doctoral

Luis Carretero Rodríguez

Oviedo, 2014









**RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL**

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Rutas de transducción de señales y procesos de fosforilación implicados en la regulación de canales <i>erg</i> por TRH	Inglés: Signal transduction pathways and phosphorylation processes involved in <i>erg</i> channels regulation by TRH.
2.- Autor	
<b>Nombre:</b> LUIS CARRETERO RODRIGUEZ	<b>DNI/Pasaporte/NIE:</b>
Programa de Doctorado: Biología funcional y molecular (interdepartamental)	
Órgano responsable: BIOLOGIA FUNCIONAL	

**RESUMEN (en español)**

Los canales de  $K^+$  *erg* se expresan en distintos tipos celulares, habiéndoseles relacionado con el control del potencial de membrana basal, la excitabilidad celular, la secreción, la proliferación celular y la duración del potencial de acción cardíaco. En células adenohipofisarias la regulación de estos canales constituye un punto crucial de control de la actividad eléctrica que dirige la secreción de prolactina tras la activación del receptor de TRH. Aunque se sabe que este receptor está acoplado a proteínas G y se conocen otros pormenores, se desconocen aún varios de los componentes de la ruta de señalización que une el receptor de TRH con la modulación de la corriente *erg*.

El trabajo recogido en esta tesis doctoral engloba dos partes, a veces solapantes: por un lado el estudio de posibles componentes específicos implicados en la cascada de señalización desde el receptor de TRH hasta los canales *erg*, y por otro lado el estudio de los cambios en fosforilación inducidos por la TRH a nivel del proteoma de las células, y más específicamente sobre la fosforilación de los propios canales *erg*. Los dos tipos de estudio se han desarrollado utilizando tanto células GH<sub>3</sub> que expresan estos canales y el receptor de TRH de forma endógena, como células HEK-H36/T1 que expresan estos dos elementos de forma heteróloga. En ambos casos, la adición de la TRH a las células provoca una rápida modulación de carácter inhibitorio sobre las corrientes *erg*.

En primer lugar, en cuanto a los componentes de la cascada de señalización de la TRH, hemos visto que su receptor se acopla a diferentes elementos de respuesta en función del tipo celular. Así, mientras que los dímeros  $\beta\gamma$  tienen un papel fundamental en la modulación de *erg* por TRH en células GH<sub>3</sub>, no parecen estar implicados en la ruta correspondiente en células HEK-H36/T1. Además, mediante técnicas de interferencia de RNA e inhibidores farmacológicos, hemos estudiado la implicación de diversas proteínas quinasas en estas rutas de señalización. Así, hemos verificado que la presencia de la proteína Akt juega un papel fundamental en la correcta transmisión de la señal de TRH en células HEK-H36/T1, pero no en células GH<sub>3</sub>. También hemos mostrado que el bloqueo de la expresión de la quinasa PASK no produce un efecto apreciable en la modulación de *erg* por la TRH en ninguno de los dos tipos celulares. Por último, hemos demostrado que las quinasas ERK1/2 son necesarias para la correcta transmisión de la señal de la TRH en células GH<sub>3</sub>, aunque no están implicadas en la ruta correspondiente en las células HEK-H36/T1.

En segundo lugar estudiamos los cambios en fosforilación observados tras la adición de TRH, utilizando técnicas de espectrometría de masas y fosfoproteómica cuantitativa. Mediante estos experimentos hemos logrado identificar múltiples proteínas cuyos estados de fosforilación varían tras el tratamiento con TRH, en concreto 261 en células HEK-H36/T1 y 98 en GH<sub>3</sub>, de las cuales 13 son comunes a los dos tipos celulares. Destacan entre ellas las quinasas ERK1 y ERK2, en las que hemos observado un marcado incremento en los niveles de fosforilación de los residuos responsables de su activación por la quinasa MEK1/2, y la proteína MARCKS, un sustrato de la PKC. También hemos estudiado la fosforilación de los canales *erg*, que sólo ha sido posible en las células HEK-H36/T1 por su baja expresión en las GH<sub>3</sub>. Así hemos encontrado 14 sitios de fosforilación de hERG, dos de los cuales (S250 y S261) no habían sido identificados previamente. El estado de fosforilación de otros dos de esos sitios (S239 y S1137) aumenta notablemente tras el tratamiento con TRH. A partir de estos sitios de fosforilación detectados en hERG hemos generado mutantes específicos sustituyendo los



residuos fosforilables por alaninas. Por fin, se ha estudiado el efecto de estas mutaciones a nivel electrofisiológico, y se ha observado que la eliminación de cualquiera o todos esos sitios de fosforilación no presenta un efecto notable sobre las características electrofisiológicas del canal mutante, ni sobre los efectos de la TRH sobre el mismo.

## RESUMEN (en Inglés)

The *erg* K<sup>+</sup> channels are expressed in different cell types, and they have been related to control of basal membrane potential, cell excitability, secretion, cell proliferation and duration of the cardiac action potential. In pituitary cells regulation of these channels is a crucial point in controlling the electrical activity that directs prolactin secretion after TRH receptor activation. The fact that these receptors are coupled to G proteins and some other details are well known, yet several components of the signaling pathway that links TRH receptor with the modulation of the *erg* current are unknown.

The work collected in this thesis comprises two sometimes overlapping parts: one is the study of possible specific components involved in the signaling cascade from TRH receptor to *erg* channels, and the other one is the study of the changes in phosphorylation induced by TRH at the level of the cell proteome, and particularly on the phosphorylation of *erg* channels. The two types of study have been developed using both GH<sub>3</sub> cells endogenously expressing these channels and TRH receptor, and HEK-H36/T1 cells heterologously expressing those two elements. In both cases, TRH addition to the cells causes a rapid inhibitory modulation on the *erg* currents.

Firstly, in terms of the components of the TRH signaling cascade, we have seen that its receptor is coupled to different response elements depending on the cell type. Thus, while  $\beta\gamma$  dimers have a fundamental role in *erg* modulation by TRH in GH<sub>3</sub> cells, they do not seem to be involved in the corresponding pathway in HEK-H36/T1 cells. Furthermore, using techniques of RNA interference and pharmacological inhibitors, we have studied the implication of different protein kinases in these signaling pathways. Thus, we have verified that the presence of the Akt protein plays a fundamental role in the correct transmission of TRH signal in HEK-H36/T1 cells, but not in GH<sub>3</sub> cells. We have also shown that PASK kinase silencing does not produce an appreciable effect in the modulation of *erg* by TRH in any of the two cell types. Finally, we have demonstrated that ERK1/2 kinases are necessary for the correct transmission of TRH signal in GH<sub>3</sub> cells, but they are not involved in the corresponding pathway in HEK-H36/T1 cells.

Secondly, we studied the changes in phosphorylation in response to TRH using mass spectrometry and quantitative phosphoproteomics techniques. Through these experiments, we have managed to identify multiple proteins whose phosphorylation status vary after cells treatment with TRH, in particular 261 in HEK-H36/T1 and 98 in GH<sub>3</sub>, 13 of which are common to the two cell types. Highlights include ERK1 and ERK2 kinases, in which we have observed a marked increase in phosphorylation levels of the residues that determine its activation by the MEK1/2 kinase, and MARCKS protein, a PKC substrate. We have also studied *erg* channels phosphorylation, which has been only possible in HEK-H36/T1 cells due to their low expression in GH<sub>3</sub>. We have thus found 14 phosphorylation sites in hERG, two of which (S250 and S261) had not previously been identified. The phosphorylation state of two more of those sites (S239 and S1137) increases significantly after TRH treatment. We generated specific mutants for these hERG phosphorylation sites by replacing by alanines the phosphorylatable residues. Finally, we have studied the effect of these mutations at the electrophysiological level, and we have observed that elimination of any or all of these phosphorylation sites do not have a remarkable effect on the electrophysiological characteristics of the mutant channel, neither on the TRH effects on it.





## Abreviaturas:

**2D-PAGE:** *Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis* (electroforesis en geles de acrilamida de dos dimensiones).

**AMPC:** Adenosín mono fosfato cíclico.

**ANOVA:** Análisis de la varianza.

**CDK:** *Cyclin-dependent kinase* (quinasa dependiente de ciclina).

**cDNA:** *Complementary DNA* (ADN complementario).

**CHO:** *Chinese hamster ovary*, línea celular de ovario de hámster chino.

**cNBD:** *Cyclic nucleotide binding domain* (dominio de unión a nucleótidos cíclicos).

**CTX:** *Cholera Toxin* (toxina del cólera).

**DAG:** 1,2-diacilglicerol.

**DMEM:** *Dulbecco's modified Eagle medium* (medio Eagle modificado según Dulbecco).

**DMSO:** Dimetil sulfóxido.

**Dominio PH:** Dominio *pleckstrin homology* (homología a pleckstrina).

**dsDNA:** *Double-stranded DNA* (ADN de doble cadena).

**dsRNA:** *Double-stranded RNA* (ARN de doble cadena).

**eag:** *ether-á-go-go*.

**EGF:** *Epidermal growth factor* (factor de crecimiento epidérmico).

**eGFP:** *Enhanced green fluorescent protein* (proteína fluorescente verde de fluorescencia incrementada).

**EGFR:** *Epidermal growth factor receptor* (receptor del factor de crecimiento epidérmico).

**elk:** *eag-like*.

**erg:** *ether-á-go-go related gene*.

**ERK:** *Extracellular signal-regulated kinase* (quinasa regulada por señal extracelular).

**eYFP:** *Enhanced yellow fluorescent protein* (proteína fluorescente amarilla de fluorescencia incrementada).

**GPCR:** *G protein-coupled receptors* (receptores de membrana acoplados a proteínas G).

**GSK3:** *Glycogen synthase kinase 3* (glucógeno sintasa quinasa 3).

**HEK293:** *Human embryonic kidney*, línea celular embrionaria de riñón humano.

**HEPES:** Ácido N-(2-hidroximetil)piperazina-N-(2-etanosulfónico).

**IGF:** *Insulin growth factor 1* (factor de crecimiento insulínico tipo 1).

**IP<sub>3</sub>:** Inositol-1,4,5-trisfosfato.

**LC-MS/MS:** *Liquid chromatography-tandem mass spectrometry* (espectrometría de masas tandem acoplada a cromatografía líquida).

**MALDI-ToF:** *Matrix assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry* (espectrometría de masas de tiempo de vuelo con desorción/ionización láser asistida por matriz).

**MAP-2:** *Microtubule-associated protein 2* (proteína asociada a microtúbulos 2).

**MAPK:** *Mitogen-activated protein kinase* (proteína quinasa activada por mitógenos).

**miRNAs:** Micro RNAs.

**mRNA:** *Messenger RNA* (ARN mensajero).

**MS:** *Mass spectrometry* (espectrometría de masas).

**NGF:** *Nerve growth factor* (factor de crecimiento nervioso).

**NO:** *Nitric oxide* (óxido nítrico).

**PAS:** *Per-ARNT-Sim*.

**PASK:** *PAS domain containing serine/threonine kinase* (proteína serina/treonina quinasa que contiene el dominio PAS).

**PCR:** *Polymerase chain reaction* (reacción en cadena de la polimerasa).

**PDC:** *Phosducin* (fosducina).

**PDGF:** *Platelet-derived growth factor* (factor de crecimiento derivado de plaquetas).

**PDK1:** *Phosphoinositide-dependent kinase-1* (quinasa dependiente de fosfoinosítido 1).

**PH:** *Pleckstrin homology* (homología a pleckstrina).

**PI3K:** *Phosphoinositide 3-kinase* (fosfatidilinositol 3 quinasa).

**PIP<sub>2</sub>:** Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato.

**PIP<sub>3</sub>:** Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato.

**PKA:** *Protein kinase A* (proteína quinasa A).

**PKB/Akt:** *Protein kinase B* (proteína quinasa B), Akt.

**PKC:** *Protein kinase C* (proteína quinasa C).

**PLC:** *Phospholipase C* (fosfolipasa C).

**PMA:** Forbol-12-miristato-13-acetato.

**PP<sub>2A</sub>:** *Phosphatase protein 2a* (proteína fosfatasa 2a).

**PRL:** Prolactina.

**PVDF:** Polifluoruro de vinilideno.

**RISC:** *RNA induced silencing complex* (complejo de silenciamiento inducido por ARN).

**RNAi:** *RNA interference* (interferencia de ARN).

**RSK:** *Ribosomal s6 kinase* (quinasa ribosomal s6).

**RT:** *Reverse transcription* (transcripción reversa).

**RTK:** *Receptor tyrosine kinases* (receptor tirosina quinasa).

**S.E.M.:** *Standard error of the mean* (error estandar de la media).

**SDS:** Dodecil sulfato sódico.

**SDS-PAGE:** *SDS-polyacrylamide gel electrophoresis* (electroforesis en geles de acrilamida en presencia de SDS).

**siRNAs:** *Small interfering RNAs* (ARNs pequeños de interferencia).

**ssRNA:** *Single-stranded RNA* (ARN de cadena simple).

**TFA:** Ácido trifluoroacético.

**T.I.V.:** Transcripción *in vitro*.

**TRH:** *Thyrotropin-releasing hormone* (hormona liberadora de tirotrópina).

**TRHR:** *Thyrotropin-releasing hormone receptor* (receptor de la hormona liberadora de tirotrópina).

**TSH:** *Thyroid-stimulating hormone, thyrotropin* (hormona estimulante del tiroides, tirotrópina).

**UPLC:** *Ultra-high Performance Liquid Chromatography* (cromatografía líquida de ultra-alta eficacia)

# Índice

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Los canales de K<sup>+</sup> <i>erg</i></b>	<b>3</b>
1.1.1. General.	3
1.1.2. Estructura.	4
1.1.3. Cinética.	5
1.1.4. Papel del extremo amino en la cinética del canal.	7
1.1.5. Expresión tisular y funciones.	8
1.1.6. Regulación de los canales <i>erg</i> .	11
1.1.6.1. Regulación por PKA y PKC.	11
1.1.6.2. Regulación por otras proteínas quinasas.	13
1.1.6.3. Regulación por segundos mensajeros.	13
1.1.7. Regulación hormonal de los canales <i>erg</i> por TRH.	14
<b>1.2. La proteína quinasa PKB/Akt.</b>	<b>18</b>
<b>1.3. La proteína quinasa del dominio PAS, PASK.</b>	<b>21</b>
<b>1.4. La proteína quinasa regulada por señales extracelulares ERK.</b>	<b>22</b>
1.4.1. Activación de ERK por receptores acoplados a proteínas G.	25
1.4.2. Activación de ERK por transactivación de receptores tirosina quinasa.	26
1.4.3. Activación de ERK por TRH.	27
<b>1.5 Técnicas de RNAi y espectrometría de masas.</b>	<b>27</b>
1.5.1 Interferencia de RNA.	27
1.5.2 Espectrometría de masas.	29
<b>2. Objetivos.</b>	<b>31</b>
<b>3. Materiales y métodos.</b>	<b>35</b>
<b>3.1. Materiales.</b>	<b>37</b>
3.1.1. Tampones y disoluciones.	37
3.1.2. Enzimas y kits.	37
3.1.3. Materiales biológicos.	37
3.1.4. Anticuerpos.	38
3.1.5. Inhibidores.	38
3.1.6. Varios.	38
<b>3.2. Métodos.</b>	<b>39</b>
3.2.1. Técnicas básicas en Biología Molecular.	39

3.2.2. Cultivo y transfección de las líneas celulares. ....	39
3.2.3. Medidas electrofisiológicas. ....	40
3.2.4. Detección de las variaciones de Ca <sup>2+</sup> citoplasmático mediante el colorante fluorescente Fura-2.....	41
3.2.5. Análisis estadístico.....	42
3.2.6. Extracción del RNA. ....	42
3.2.7. Diseño y preparación de siRNAs.....	43
3.2.7.1. Obtención de una mezcla de siRNAs contra Akt humano.....	43
3.2.7.2. Obtención de mezclas de siRNAs contra Akt1 de rata. ....	46
3.2.7.3. Obtención de mezclas de siRNAs contra PASK humana y de rata. ....	47
3.2.7.4. Diseño de siRNAs específicos contra Akt1 humano y de rata.....	47
3.2.7.5. Uso de siRNAs específicos contra ERK1 y ERK2.....	49
3.2.8. Obtención de extractos celulares y análisis western. ....	50
3.2.9. Electroforesis bidimensional. ....	51
3.2.10. PCR cuantitativa.....	51
3.2.11. Enriquecimiento de fosfoproteínas mediante columnas de purificación.....	53
3.2.12. Inmunoprecipitación de <i>erg</i> . ....	53
3.2.13. Espectrometría de masas MALDI-ToF. ....	54
3.2.14. Tratamiento con N-glicosidasa. ....	55
3.2.15. Fosfoproteómica cuantitativa. ....	55
3.2.15.1. Fosfoenriquecimiento con TiO <sub>2</sub> .....	55
3.2.15.2. Digestión de bandas proteicas para su análisis mediante LC-MS/MS. ....	56
3.2.15.3. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas tándem.....	57
3.2.16. Mutagénesis dirigida mediante PCR.....	58
<b>4. Resultados.....</b>	<b>61</b>
<b>4.1. Estudios comparativos de las acciones de la TRH en células GH<sub>3</sub> y HEK-H36/T1.....</b>	<b>63</b>
4.1.1. Estudio de la dependencia de la dosis en los efectos de la TRH observados en células GH <sub>3</sub> y HEK-H36/T1.....	63
4.1.1.1. Efecto de la TRH sobre las concentraciones intracelulares de Ca <sup>2+</sup> .....	63
4.1.1.2. Efecto de la TRH sobre las corrientes <i>erg</i> .....	65
4.1.1.3. Efectos de la TRH en células GH <sub>3</sub> sobreexpresando el receptor de TRH. ....	70

4.1.2. Efecto de los secuestradores de dímeros $\beta\gamma$ de proteínas G sobre las respuestas inducidas por la TRH. ....	72
<b>4.2. Estudios sobre la participación de quinasas específicas en las rutas de señalización entre el receptor de TRH y los canales <i>erg</i>.</b> .....	<b>78</b>
4.2.1. Estudio de la posible implicación de PKB/Akt en la ruta de señalización. ....	78
4.2.1.1. Estudio de la posible implicación de Akt/PKB en células HEK-H36/T1. ....	78
4.2.1.1.1. Silenciamiento con mezclas de siRNAs de la expresión endógena de las isoformas de Akt humano en células HEK-H36/T1.....	78
4.2.1.1.2. Efecto del silenciamiento de Akt con mezclas de siRNAs sobre la modulación de hERG por TRH en células HEK-H36/T1.....	80
4.2.1.1.3. Efecto de siRNAs específicos contra hAkt1 sobre la expresión de la quinasa y sobre la respuesta de los canales hERG a TRH en células HEK-H36/T1. ....	84
4.2.1.2. Estudio de la posible implicación de Akt/PKB en la ruta de señalización desde el receptor de TRH hasta los canales rERG en células GH <sub>3</sub> . ....	87
4.2.1.2.1. Efectos de la mezcla de siRNAs contra Akt1 de rata en los niveles de expresión de la quinasa y la modulación de rERG por TRH en células GH <sub>3</sub> . ....	87
4.2.1.2.2. Estudio del efecto silenciador de los siRNAs específicos contra rAkt1 y de su acción sobre la regulación del canal rERG por TRH en células GH <sub>3</sub> .....	90
4.2.1.3. Efecto de la insulina en la respuesta de <i>erg</i> a la TRH. ....	93
4.2.1.4. Fosforilación/activación de Akt por TRH. ....	96
4.2.2. Estudio de la posible participación de la quinasa PASK en la ruta de señalización desde el receptor de TRH hasta los canales <i>erg</i> . ....	98
4.2.3. Estudio de la posible implicación de ERK1/2 en la ruta de señalización desde el receptor de TRH hasta los canales <i>erg</i> . ....	101
4.2.3.1. Efectividad del silenciamiento de ERK1 y ERK2 por siRNAs específicos en células HEK-H36/T1 y GH <sub>3</sub> .....	103
4.2.3.2. Efecto de los siRNAs para ERK1 y ERK2 sobre la regulación de los canales <i>erg</i> por TRH en células HEK-H36/T1 y GH <sub>3</sub> . ....	105
4.2.3.3. Efecto de la inhibición de MEK sobre la respuesta de los canales <i>erg</i> a TRH. ...	108
4.2.3.3.1. Efecto de los inhibidores de MEK sobre la activación de ERK1/2 por TRH en células HEK-H36/T1 y GH <sub>3</sub> . ....	108

4.2.3.3.2. Efecto de los inhibidores de MEK sobre la modulación hormonal de los canales hERG por la TRH en células HEK-H36/T1.....	111
4.2.3.3.3. Efecto de los inhibidores de MEK sobre la modulación hormonal de los canales rERG por la TRH en células GH <sub>3</sub> .....	113
4.2.3.4. Efecto del EGF en la modulación por la TRH de los canales rERG de las células GH <sub>3</sub> .....	116
<b>4.3. Estudio de los cambios en fosforilación provocados por el tratamiento de células GH<sub>3</sub> y HEK-H36/T1 con la hormona TRH.....</b>	<b>118</b>
4.3.1. Análisis de los cambios en fosforilación en respuesta a TRH mediante electroforesis bidimensional y espectrometría de masas MALDI-ToF.....	119
4.3.2. Análisis mediante fosfoproteómica cuantitativa de los cambios en fosforilación en respuesta a TRH.....	130
<b>4.4. Estudio de los canales erg a nivel molecular: interacciones proteicas y fosforilación..</b>	<b>135</b>
4.4.1 Optimización de la detección de las proteínas <i>erg</i> .....	135
4.4.2. Inmunoprecipitación de canales <i>erg</i> .....	136
4.4.3. Estudios de fosforilación de los canales <i>erg</i> .....	144
4.4.4. Identificación proteómica de los sitios de fosforilación del canal hERG y sus cambios en respuesta a TRH en células HEK-H36/T1.....	148
4.4.4. Mutación de los sitios de fosforilación de hERG y su efecto en las características funcionales del canal y en la respuesta de éste a la TRH.....	151
<b>5. Discusión.....</b>	<b>157</b>
<b>6. Conclusiones.....</b>	<b>177</b>
<b>7. Conclusions.....</b>	<b>181</b>
<b>Bibliografía:.....</b>	<b>185</b>
<b>Publicaciones.....</b>	<b>199</b>



# 1. Introducción



## 1. Introducción.

## 1.1. Los canales de K<sup>+</sup> *erg*.

### 1.1.1. General.

Los canales de K<sup>+</sup> *erg* pertenecen a la superfamilia de los canales de K<sup>+</sup> dependientes de voltaje o Kv, dentro de la cual se engloban en la familia de canales *ether-à-go-go* (*eag*). El canal *eag*, primer miembro de esta familia, se identificó a partir de un mutante de *Drosophila melanogaster* cuyo fenotipo se caracterizaba por una agitación característica de las patas al anestésiar al animal con éter (Kaplan y Trout 1969). Mediante el análisis filogenético de sus secuencias, la familia *eag* se divide en tres subfamilias: *ether-à-go-go* (*eag*), Kv10.x; *eag-related-gene* (*erg*), Kv11.x; y *eag-like* (*elk*), Kv12.x (Warmke y Ganetzky 1994; Trudeau *et al.* 1995). Dentro de la subfamilia *erg* se han identificado hasta ahora tres miembros: KCNH2 (*erg1*, Kv11.1), KCNH6 (*erg2*, Kv11.2) y KCNH7 (*erg3*, Kv11.3); los parálogos correspondientes existen en varias especies, incluyendo la humana (Shi *et al.* 1997; Bauer *et al.* 2003). En este trabajo utilizaremos el nombre oficial del gen, KCNH2, para referirnos al mRNA, *erg* para referirnos a los canales de la subfamilia, y las denominaciones hERG o rERG cuando nos refiramos a la proteína *erg1* humana o de rata respectivamente. El gen KCNH2 para el canal hERG se localiza en el cromosoma 7. El análisis de su secuencia sugiere que la proteína debe poseer características tanto de canales Kv (ver más adelante) como de canales regulados por nucleótidos cíclicos, pues posee un dominio de unión a éstos en la región carboxilo terminal citoplasmática (Guy *et al.* 1991; Warmke y Ganetzky 1994).

En el gen KCNH2 humano existen al menos tres sitios de inicio de la transcripción que dan las isoformas KCNH2-1a (predominante en el corazón), KCNH2-1b (también presente en el corazón) y KCNH2-3.1 (con mayor presencia en tejidos neuronales) (Lees-Miller *et al.* 1997; London *et al.* 1997; Itoh *et al.* 1998; Huffaker *et al.* 2009). Una vez el mRNA es sintetizado y llega al citosol, se asocia con ribosomas y comienza a traducirse, hasta que se reconoce la señal transmembrana y se produce la translocación a través de la membrana del retículo endoplásmico. Durante la síntesis de la proteína se va produciendo el plegamiento de la misma ayudado por numerosas chaperonas moleculares, tanto en el retículo endoplásmico como en el citosol (Ficker *et al.* 2003; Nanduri *et al.* 2009; Walker *et al.* 2007, 2010). Una vez que la proteína se ha plegado correctamente estas chaperonas se liberan y se realiza el paso de los canales al aparato de Golgi, donde se produce una glicosilación previa a su migración a la membrana plasmática. La proteína hERG *core-glycosylated* tiene una masa molecular de 135

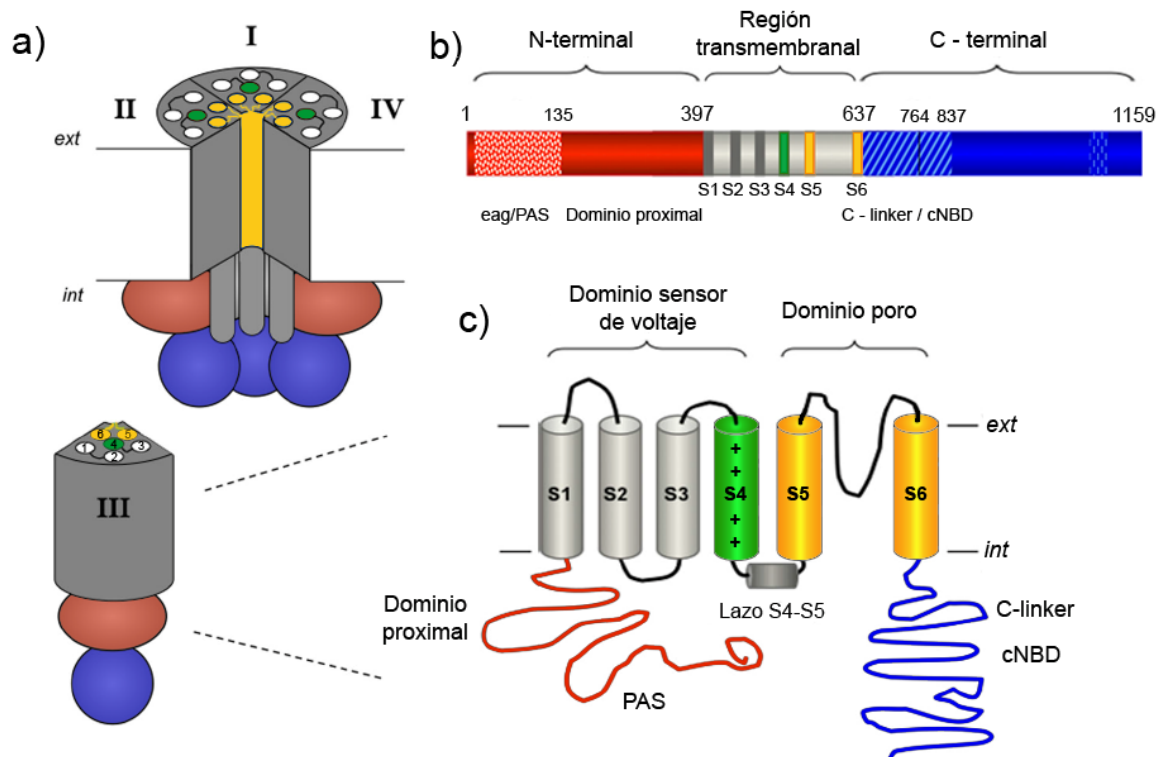
## 1. Introducción.

kDa y es sensible a desglicosilación por Endo H (Gong *et al.* 2002). En el propio aparato de Golgi adquiere más glicosilaciones complejas, sensibles al tratamiento con PNGasa, aumentando unos 20 kDa su tamaño (Gong *et al.* 2005). Estas segundas glicosilaciones están localizadas en un sitio de N-glicosilación situado en la Asn 598 (Gong *et al.* 2002).

### 1.1.2. Estructura.

Todos los canales de la familia *eag* presentan una organización muy similar a la de otros canales Kv, estando constituidos por cuatro subunidades  $\alpha$  homólogas que se coensamblan en la membrana formando un poro conductor hidrofílico (ver Figura 1), mientras que los extremos amino y carboxilo terminales se mantienen en la cara citoplasmática (Roosild *et al.* 2004). A estas subunidades  $\alpha$  pueden asociarse otras subunidades  $\beta$  de carácter regulador, que pueden alterar las características cinéticas del canal y/o su función fisiológica (Abbott *et al.* 1999). Una característica distintiva de hERG es que posee el extremo amino terminal más largo de todos los miembros de la familia *eag* y del resto de canales Kv. Dentro de esta región, que comprende aproximadamente unos 400 aminoácidos hasta la primera hélice transmembranal, se encuentra un dominio inicial conservado en todos los canales de la familia *eag*, denominado por ello dominio *eag* (aminoácidos 1 a 135 de la secuencia de hERG), el cual incluye un dominio PAS (Per-Arnt-Sim) que comprende los aminoácidos 26-135 y un dominio Cap compuesto por una cola amino desestructurada (aminoácidos 1 a 13) y una hélice alfa anfipática (aminoácidos 13 a 26) (Li *et al.* 2010; Ng *et al.* 2011; Muskett *et al.* 2011) (Figura 1). A su vez, el dominio *eag* está seguido de una secuencia exclusiva de hERG denominada dominio proximal (Viloria *et al.* 2000; Gómez-Varela *et al.* 2003a; Gustina y Trudeau 2012). A continuación se encuentran seis segmentos de hélices  $\alpha$  transmembranales, de los cuales las hélices S1 a S4 forman el dominio sensor de voltaje. La hélice S4 presenta una alta densidad de residuos cargados positivamente, y constituye el componente esencial para detectar los cambios de potencial a través de la membrana. Por su parte, las hélices S5 y S6 y los residuos entre ambas forman el dominio del poro. Como indicaremos más adelante, el lazo entre las hélices S4-S5 tiene un papel importante en el control de la apertura y cierre del canal, pues es el encargado de transmitir el movimiento de S4 en respuesta al voltaje hasta la compuerta que ocluye el poro de conducción en su cara citoplásmica. Además, se han descrito interacciones entre ese lazo S4-S5 y otros dominios citoplásmicos de hERG que parecen importantes en el control de la funcionalidad del canal (Li *et al.* 2010; de la Peña *et al.* 2011; Fernández-Trillo *et al.* 2011). Por último, el extremo carboxilo de hERG contiene en su parte inicial un dominio denominado "C-linker" y otro de

unión a nucleótidos cíclicos (cNBD) (Figura 1), recientemente se ha visto que el cNBD interacciona con el dominio *eag* de la región amino del canal pudiendo estar también implicado en la regulación de la apertura y cierre del canal (Haitin *et al.* 2013). La presencia de estos dominios en la región carboxilo terminal hace que hERG presente un mayor grado de similitud con los canales activados por nucleótidos cíclicos y los activados por hiperpolarización que con otros canales dependientes de voltaje (Warmke y Ganetzky 1994).

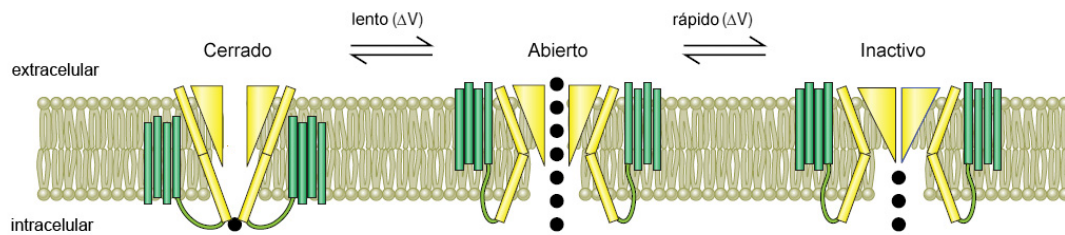


**Figura 1. Topología y estructura de los canales hERG.** a) representación esquemática de la organización tetramérica de un canal hERG ensamblado en la membrana. b) diagrama lineal de la secuencia de hERG y c) representación esquemática de la topología de una de las cuatro subunidades que forman el canal. Modificada de Barros *et al.* 2012.

### 1.1.3. Cinética.

La mayoría de los canales de  $K^+$  dependientes de voltaje pueden adoptar al menos tres conformaciones básicas: cerrado, abierto e inactivo, de las cuales sólo el canal abierto es capaz de conducir iones  $K^+$ . Estas tres conformaciones se encuentran en equilibrio entre ellas, estando el estado cerrado favorecido por voltajes intracelulares negativos, mientras que los positivos favorecen los estados abierto e inactivo (Figura 2).

## 1. Introducción.

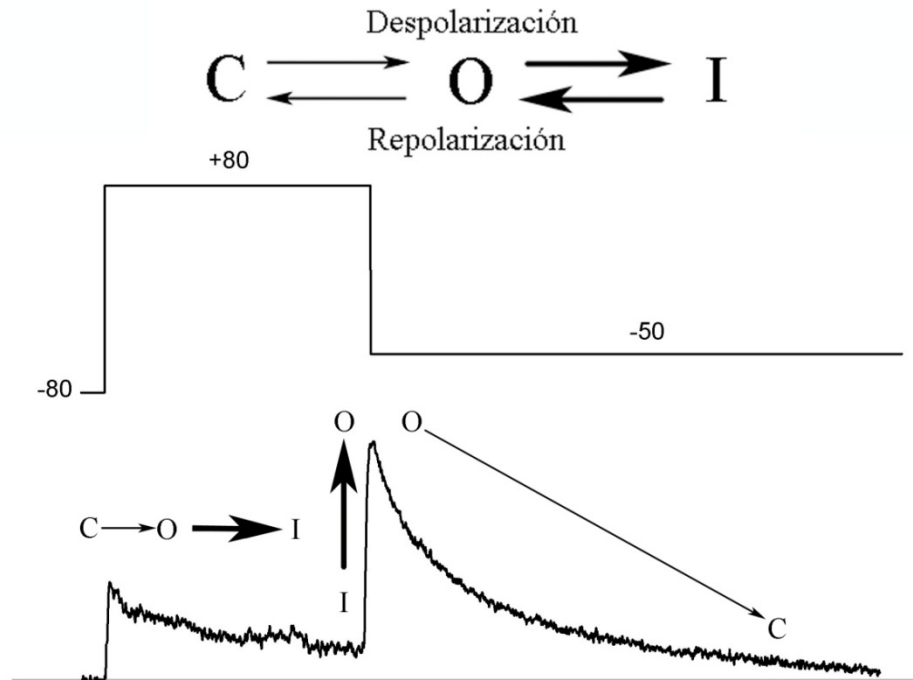


**Figura 2. Los canales *erg* pueden existir en tres conformaciones diferentes: cerrado, abierto e inactivo.** La transición entre estos estados es dependiente de voltaje, estando favorecidos los pasos de cerrado a abierto e inactivo por los potenciales intracelulares más positivos. En el esquema se representan dos de las cuatro subunidades  $\alpha$ , con la actividad conductora asociada al estado conformacional abierto representada mediante círculos fluyendo a través de la bicapa. Modificado de Vandenberg *et al.* 2012.

De acuerdo con este modelo, una célula en estado basal con el interior de la membrana bastante negativo, tendrá estos canales de  $K^+$  mayoritariamente cerrados. Al producirse una despolarización se activan, en general rápidamente, de forma que la probabilidad de encontrar un canal abierto aumenta mucho y la conductancia de la membrana al  $K^+$  se incrementa notablemente. Una despolarización larga puede causar rápidos cambios conformacionales adicionales en el canal, que pasa a un estado inactivo en el que no conduce corriente. Al repolarizarse la membrana, el canal se recupera también rápidamente de la inactivación volviendo al estado abierto, tras el cual pasa finalmente al estado cerrado (Figura 3).

A diferencia de los canales  $K_v$  típicos, al despolarizar los canales *erg1* sólo se observa una pequeña corriente, que es de salida bajo condiciones fisiológicas con alta concentración de  $K^+$  intracelular y baja extracelular. Es al repolarizar cuando se observa un mayor flujo de  $K^+$  (Figura 3), a pesar de que en este caso y a concentraciones fisiológicas la fuerza ión-motriz para el  $K^+$  es mucho menor que al despolarizar (Figura 3). Este comportamiento se debe a una peculiar combinación cinética característica de este canal, con una velocidad de activación muy lenta y una velocidad de inactivación muy rápida, lo cual limita notablemente el paso de corriente durante la despolarización. A su vez, al repolarizar se produce el efecto opuesto, ya que el canal inactivado pasa rápidamente a abierto, y permanece en este estado durante bastante tiempo debido al cierre particularmente lento de hERG (Trudeau *et al.* 1995; Smith *et al.* 1996; Wang *et al.* 1997a). Por tanto, en el caso de los canales hERG la repolarización produce un aumento transitorio de las corrientes, cuya magnitud es muy superior a las de las corrientes detectadas durante la despolarización. Así pues, aunque estructuralmente los canales *erg* pertenecen al grupo de canales  $K_v$  con rectificación normal y cuya conductancia aumenta al despolarizarse la célula, esta propiedad de transportar mayores niveles de corriente iónica a potenciales negativos hace que hERG tenga un comportamiento propio de canales con

rectificación anómala (Bauer *et al.* 1990). Como veremos más adelante, estas características cinéticas y funcionales son esenciales para la contribución fisiológica que estos canales ejercen en distintos tejidos.



**Figura 3. Registro de una corriente hERG en condiciones fisiológicas.** El protocolo de estimulación se presenta sobre el trazo de corriente. En la parte superior se muestra la relación de los equilibrios implicados en el funcionamiento del canal. Nótese el mayor grosor de las flechas relacionadas con el estado inactivo del canal para indicar que esas transiciones son mucho más rápidas. C, O e I representan los estados cerrado, abierto e inactivo, respectivamente.

#### 1.1.4. Papel del extremo amino en la cinética del canal.

En el caso del canal hERG, se ha demostrado que los dominios *eag* y proximal están implicados en la regulación selectiva del cierre y apertura del canal, respectivamente (Viloria *et al.* 2000; Gómez-Varela *et al.* 2002). Estos y otros datos de nuestro laboratorio son compatibles con un modelo cinético en el que la interacción del dominio conservado *eag* con el cuerpo central favorece la activación del canal y dificulta el cierre. En este modelo asimismo, la función del dominio proximal exclusivo de hERG podría ser la de ralentizar la interacción del dominio *eag* con la región central de la proteína del canal, seguramente a nivel del lazo S4-S5, puesto que la eliminación de dicho dominio proximal confiere al canal una tasa de apertura mucho más rápida (Viloria *et al.* 2000; Viloria C.G. 2000, Tesis Doctoral; Gómez-Varela *et al.* 2002). Nuestros estudios más recientes de formación de puentes disulfuro tras la introducción dirigida de cisteínas en las regiones N-terminal y lazo S4-S5, en particular en las posiciones 3 y 542, han

## 1. Introducción.

demostrado la proximidad de estas dos regiones, sugiriendo de nuevo que la interacción entre ellas juega un papel fundamental en la maquinaria de apertura del canal hERG, contribuyendo a sus peculiares características electrofisiológicas (de la Peña *et al.* 2011). También hemos demostrado que la coexpresión de una secuencia codificante para el dominio *eag* aislado es capaz de restaurar la propiedades de desactivación normales de canales carentes en todo o en parte del extremo amino, y que esta restitución de las características electrofisiológicas no es eficiente cuando los canales portan también una mutación puntual Y542C en el lazo S4-S5, lo cual de nuevo apunta a la existencia de una interacción entre dicho lazo y el amino terminal de hERG (Fernández-Trillo *et al.* 2011). Por otra parte, existen datos que demuestran que la región proximal del amino es necesaria para la normal regulación hormonal de hERG por TRH (hormona liberadora de tirotropina) en oocitos de *Xenopus* que co-expresan hERG y el receptor de dicha hormona (Alonso-Ron *et al.* 2009). Así pues, parece que la correcta arquitectura del dominio proximal es importante para la modulación de hERG por la TRH, modulación que parece transmitirse a la región transmembrana del canal mediante interacciones entre los dominios citoplásmicos y el lazo S4-S5 (Gómez-Varela *et al.* 2003a; Alonso-Ron *et al.* 2009; Fernández-Trillo *et al.* 2011).

### 1.1.5. Expresión tisular y funciones.

Los canales *erg* se expresan en muchos tejidos de varias especies de mamíferos y del género *Drosophila* (Shi *et al.* 1997; Wang *et al.* 1997b; Bauer *et al.* 1998; Zehelein *et al.* 2001). Su presencia en tejidos como el cardíaco, el nervioso o el endocrino, así como los estudios de sus características cinéticas, realizados tanto en células en las que el canal se expresa de forma endógena (como las GH<sub>3</sub> adenohipofisarias) como en sistemas heterólogos de expresión (como los oocitos de *Xenopus* o las células HEK293), han sugerido que estos canales juegan un importante papel en diferentes procesos fisiológicos e incluso patológicos. Así:

a) En el tejido cardíaco se ha comprobado que el canal hERG, gracias a sus peculiares características funcionales, media una corriente de aparición rápida pero inicialmente reducida denominada  $I_{Kr}$  implicada en el mantenimiento de la larga meseta de despolarización característica del potencial de acción cardíaco. A medida que la despolarización acaba y comienza la repolarización, las características cinéticas de hERG provocan un aumento en la corriente de salida de  $K^+$  hacia el exterior, lo que facilita la repolarización de la membrana y la terminación del potencial de acción de los ventriculocitos cardíacos. La citada larga meseta es crucial para mantener la célula despolarizada el tiempo suficiente para permitir la entrada

desde el medio extracelular del  $\text{Ca}^{2+}$  necesario para la contracción muscular. De hecho, la implicación de hERG en el control de la duración del potencial de acción y su finalización, hace que un funcionamiento incorrecto del canal pueda dar lugar al síndrome denominado “QT largo” de tipo II, caracterizado por un alargamiento del intervalo QT del electrocardiograma que marca la duración del potencial de acción ventricular. Este síndrome conlleva un incremento en el riesgo de arritmia y muerte súbita (Curran *et al.* 1995; Sanguinetti *et al.* 1995; Spector *et al.* 1996). Como hemos comentado, la lenta tasa de cierre de hERG hace que estos canales permanezcan abiertos durante bastantes milisegundos tras la repolarización, período en el que la corriente transportada a su través será pequeña debido a que el potencial de reposo de la célula está cercano a -80 mV y por tanto el gradiente electroquímico del  $\text{K}^+$  es mínimo. Sin embargo, en el caso de que llegue una onda de despolarización prematura, los canales hERG aún abiertos dejarán pasar una gran corriente de  $\text{K}^+$ , lo cual suprimiría tal despolarización prematura y por tanto las posibles arritmias asociadas a ella (Smith *et al.* 1996; Lu *et al.* 2001). Nótese asimismo que la función cardíaca de hERG no se restringe a los ventriculocitos, ya que se ha detectado una abundante presencia del mismo en la aurícula y en las células marcapasos del nódulo sinoatrial, donde por ejemplo su modulación por acidificación podría determinar las características de la repolarización diastólica (Schram *et al.* 2002; Tamargo *et al.* 2004).

b) Se han detectado altos niveles de expresión de canales *erg* (tanto *erg1*, como *erg2* y *erg3*) en el tejido neuronal de mamíferos, (Wymore *et al.* 1997; Shi *et al.* 1997). Dadas las propiedades de lenta activación y rápida inactivación de los canales hERG, su efecto sobre los potenciales de acción neuronales es mínimo. Sin embargo, en el caso de que ocurran largas ráfagas de potenciales de acción, las corrientes tipo  $I_{kr}$  mediadas por este canal podrían aumentar dada su lenta cinética de desactivación, lo cual podría contrarrestar el flujo de  $\text{Na}^+$  y por tanto disminuir la frecuencia de las espigas e incluso poner fin a la ráfaga de potenciales de acción. Por tanto, se cree que en este contexto la función de los canales *erg* podría estar relacionada con el control de la actividad eléctrica de distintas neuronas (Papa *et al.* 2003; Sacco *et al.* 2003; Pessia *et al.* 2008). También existen canales *erg* en microglía (Zhou *et al.* 1998) y astrocitos, donde se ha sugerido que tienen un papel en el control de la homeostasis del  $\text{K}^+$  (Emmi *et al.* 2000). Los canales *erg* también han sido implicados en procesos de neuritogénesis y diferenciación (Arcangeli *et al.* 1993, 1995; Faravelli *et al.* 1996), así como en el control del potencial basal y de la actividad marcapasos de las células intersticiales de Cajal de intestino delgado (Zhu *et al.* 2003).



## 1. Introducción.

c) El papel de los canales *erg* parece especialmente importante en células neuroendocrinas como las células adenohipofisarias, las  $\beta$ -pancreáticas o las cromafines, en las que la excitabilidad es primordial para su función fisiológica de secretar neurotransmisores y hormonas (Corrette *et al.* 1995; Gullo *et al.* 2003). Así, en células adenohipofisarias (y otras células endocrinas) estos canales participan en el mantenimiento del potencial basal y con ello en el control de la actividad eléctrica y de la secreción celular. De hecho, es bien conocido que uno de los efectos secundarios de muchos fármacos neurolépticos que inhiben los canales *erg* es el aumento de los niveles de prolactina en sangre (Barros *et al.* 1994; Schäfer *et al.* 1999; Bauer *et al.* 1999). En el caso de las células adenohipofisarias, la importancia fisiológica de los canales *erg* resulta enfatizada por el hecho de que su inhibición es el mecanismo por el que ciertas hormonas como la TRH incrementan la frecuencia de producción de potenciales de acción, y con ello la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y los niveles de secreción (Barros *et al.* 1992, 1994; Bauer *et al.* 1999).

d) Se ha propuesto que el canal hERG juega un papel importante en ciertos procesos oncogénicos. En este sentido, numerosos tipos de células tumorales muestran una sobreexpresión de hERG, y su bloqueo o inhibición impide de forma drástica la proliferación celular (Arcangeli *et al.* 1995; Bianchi *et al.* 1998; Pardo *et al.* 1999; Cherubini *et al.* 2000; Crociani *et al.* 2003). No obstante, la relación entre la actividad de estos canales y la progresión del ciclo celular es una cuestión poco clara. Las características cinéticas de hERG hacen que su probabilidad máxima de apertura se encuentre a voltajes ligeramente negativos, contribuyendo de esta forma a mantener los valores más positivos de potencial de membrana que muestran las células en las que el ciclo celular está en progreso y las tumorales (Binggeli y Weinstein 1986; Chernet y Levin 2013). Así, la expresión de estos canales conferiría a las células neoplásicas una ventaja selectiva en dos aspectos: permitiendo un potencial basal más positivo acorde a su entrada en mitosis y mejorando su supervivencia en el ambiente isquémico propio del crecimiento tumoral, que conlleva una elevación de la concentración de  $\text{K}^+$  extracelular, una situación en la que la actividad de los canales hERG está favorecida (Bianchi *et al.* 1998). Más recientemente se ha puesto de manifiesto el papel del canal hERG regulando tanto la proliferación como la apoptosis de distintas líneas celulares. Así, se ha detectado expresión de hERG en un elevado caso de adenocarcinomas de endometrio, mientras que tal expresión no se produce en tejidos de endometrio sano (Cherubini *et al.* 2000). Un patrón similar se ha observado en cánceres colorrectales humanos, habiéndose demostrado la presencia de hERG en alrededor del 60 % de los casos, mientras que el canal está ausente en la mucosa normal del

colon o en lesiones hiperproliferativas no cancerosas (Lastraioli *et al.* 2004). Cabe destacar que los mayores niveles de incidencia de expresión de hERG en tumores se observan en cánceres metastáticos, restringiéndose además a los tipos más agresivos de cáncer. Por otra parte, se ha observado recientemente que algunos de los efectos de hERG sobre la proliferación tumoral en cánceres de cabeza y cuello o pulmonar de células pequeñas, no dependen de sus propiedades conductoras de  $K^+$ , sino solamente de la presencia de la proteína en estos tipos celulares (Glassmeier *et al.* 2012; Menéndez *et al.* 2012). Todos estos datos han convertido a este canal en un excelente candidato a ser usado como marcador molecular para distinguir las células tumorales de las normales o de las simplemente hiperplásicas, y abre paso a distintas alternativas terapéuticas para el tratamiento de ciertos tipos de cáncer.

### **1.1.6. Regulación de los canales *erg*.**

Como acabamos de indicar, los canales *erg* están implicados en el control de funciones como la actividad eléctrica y la secreción, que suelen estar reguladas por neurotransmisores y hormonas. Sin embargo, los mecanismos por los que las acciones de tales agentes provocan la alteración de la actividad de estos canales son en su mayoría desconocidos. Se han descrito distintos procesos de regulación de los canales tipo *erg*, que han sido estudiados tanto en líneas celulares que los expresan de forma nativa como en sistemas de expresión heteróloga. Así, en su regulación hormonal han sido implicados diferentes componentes de varias cascadas de señalización intracelular, como quinasas y fosfatasa de proteínas, proteínas adaptadoras de señalización como las de la familia 14-3-3, e incluso segundos mensajeros que se unen directamente al canal como el cAMP o el fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) (Vandenberg *et al.* 2012; Kruse *et al.* 2012).

#### **1.1.6.1. Regulación por PKA y PKC.**

En nuestro laboratorio se describió por primera vez que el éster de forbol  $\beta$ -forbol-12-miristato-13-acetato ó PMA inhibía la función de hERG expresado en oocitos de *Xenopus*, un efecto que resultaba anulado por el inhibidor de la proteína quinasa C (PKC) GF109203X. Teniendo en cuenta que el PMA y el GF109203X son un activador y un inhibidor, respectivamente, de dicha PKC, se concluyó que hERG era susceptible a regulación por ella (Barros *et al.* 1998). Sin embargo, tras comprobarse también en oocitos de *Xenopus* que el efecto del PMA sobre hERG era mimetizado y anulado, respectivamente, por activadores e

## 1. Introducción.

inhibidores específicos de la proteína quinasa A (PKA), se propuso que este enzima era el auténtico regulador de hERG en dicho sistema, y que el PMA desarrollaba un efecto inespecífico sobre la activación de proteínas quinasas (Kiehn *et al.* 1998). El posible papel de la PKA fue posteriormente enfatizado al detectarse tanto incrementos como decrementos inducidos por el AMPc en la corriente mediada por hERG similares a los observados con activadores e inhibidores de PKA, encontrándose además en hERG cuatro residuos fosforilables por dicha quinasa (Thomas *et al.* 1999; Kiehn 2000). Finalmente, se ha indicado que los efectos del PMA sobre hERG podrían ser debidos a la activación tanto de la PKA como de la PKC, y se ha propuesto que esta última no fosforila directamente al canal, sino a algunos mediadores de la señalización (Thomas *et al.* 2003).

En relación a la posible regulación de hERG por PKA y AMPc, se han realizado estudios de los canales expresados heterológamente en células CHO y HEK293, y en ellas se ha propuesto que existe un mecanismo de regulación dual por el AMPc. Así, existiría una interacción directa del nucleótido con la secuencia cNBD presente en el extremo carboxilo de hERG y por otro lado una activación por AMPc de la PKA, la cual fosforilaría a hERG en los residuos S283, S890, T895 y S1137 (Thomas *et al.* 1999; Kiehn 2000). Estas dos acciones modularían la actividad del canal aumentándola y disminuyéndola, respectivamente (Cui *et al.* 2000, 2001; Kiehn 2000). A partir de estudios de doble híbrido, se ha sugerido un mecanismo alternativo para la regulación de hERG por el AMPc y la PKA, por el cual el nucleótido activaría al enzima y este fosforilaría a hERG en los residuos S283 (dominio proximal) y S1137 (final del extremo carboxilo), haciendo que se puedan unir al canal dímeros de proteínas de la familia 14-3-3, y produciendo un aumento de la corriente (Kagan *et al.* 2002). También se ha propuesto más recientemente que existen proteínas adaptadoras interaccionando con hERG capaces de dirigir las subunidades reguladoras de la PKA hacia el canal. Estos complejos moleculares regularían los canales hERG vía AMPc/PKA durante la respuesta adrenérgica cardíaca (Li *et al.* 2008).

En cardiomiocitos ventriculares de cobaya se ha comprobado que la estimulación de receptores  $\beta$ -adrenérgicos activa tanto a la PKA como a la PKC, regulando la corriente  $I_{Kr}$  (Heath y Terrar 2000). Así, se ha indicado que la estimulación de estos receptores  $\beta$ -adrenérgicos y de su cascada de transducción, produciría un aumento en las corrientes *erg* mediado por la PKA y la PKC, al modificar la inactivación de los canales cambiando su rectificación. En este caso, se postuló que la activación de la PKC se debía a una activación previa de la PKA. En un trabajo posterior en células HEK293 transfectadas, se describió que la estimulación de receptores  $M_3$ -

muscarínicos produce una ralentización de la apertura de hERG y un desplazamiento de su dependencia de voltaje de activación, proponiéndose que estos efectos son debidos a la PKC. En este caso, tal alteración cinética se debería a la fosforilación de hERG por parte de dos tipos de PKC, la activada por  $\text{Ca}^{2+}$  y la activada por 1,2-diacilglicerol (DAG), para la cual sería necesaria la presencia del extremo amino del canal (Cockerill *et al.* 2007).

#### **1.1.6.2. Regulación por otras proteínas quinasas.**

Se ha descrito que la actividad basal de la proteína quinasa B (PKB/Akt) es necesaria para el funcionamiento normal de hERG cuando se expresa heterológicamente en células HEK293, ya que en las células transfectadas además con un dominante negativo o con una forma constitutivamente activa de la quinasa PKB se observa una reducción o un aumento de las corrientes hERG, respectivamente (Zhang *et al.* 2003), proponiéndose como sitios de fosforilación por esta quinasa los residuos S331 (dominio proximal) y S890 (extremo carboxilo). Sin embargo, el bloqueo de la posible activación de la PKB mediante la inhibición de la quinasa dependiente de fosfoinosítidos 1 (PDK1) no modifica significativamente la inhibición de la corriente rERG por la TRH en las células adenohipofisarias GH<sub>3</sub> (Gómez-Varela *et al.* 2003b).

Además de la modulación de canales *erg* por quinasas de serina/treonina, también se ha descrito que pueden ser regulados por quinasas de tirosina. Así, se ha sugerido que el canal hERG puede formar un complejo macromolecular con la tirosina quinasa Src y la tirosina fosfatasa SHP-1 en células de microglía de rata MLS-9. La actividad quinasa produciría una ganancia en la función de los canales, mientras que la actividad fosfatasa produciría el efecto contrario (Cayabyab *et al.* 2002b; Cayabyab y Schlichter 2002a). En un trabajo más reciente se ha constatado el papel de la tirosina quinasa Src en la modulación de hERG expresado en células HEK293, describiéndose además una regulación del canal por receptores con actividad tirosina quinasa (como el Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico, EGFR), que son otro tipo de tirosina quinasa diferente del de Src, siendo esta modulación mediada por fosforilación en las posiciones Y475 y Y611 (Zhang *et al.* 2008).

#### **1.1.6.3. Regulación por segundos mensajeros.**

También existe bibliografía sobre la regulación de hERG por segundos mensajeros no enzimáticos. Ya se han comentado anteriormente los trabajos acerca de la unión directa del AMPc al cNBD de hERG (Cui *et al.* 2000, 2001), así como de proteínas adaptadoras de la familia

## 1. Introducción.

14-3-3 tras la fosforilación del canal por la PKA (Kagan *et al.* 2002). También se ha descrito que en células CHO transfectadas con hERG, las elevaciones intracelulares de PIP<sub>2</sub> producen un aumento de la corriente, una aceleración de la activación junto con un desplazamiento de su dependencia de voltaje hacia potenciales más negativos, así como una ralentización de la inactivación. Se ha propuesto que hay una unión del fosfolípido al canal a través de interacciones entre la carga negativa del grupo fosfato del mismo y las cadenas laterales de residuos positivos de hERG. Se han señalado dos regiones C-terminales, con densidad de carga positiva, como las implicadas en la unión del PIP<sub>2</sub>: los aminoácidos 883-894, responsables de los efectos sobre la activación, y los aminoácidos 672-697, responsables de los efectos sobre la inactivación (Bian *et al.* 2001, 2004). Finalmente, en estos trabajos también se demostró que la estimulación de receptores  $\alpha_{1a}$ -adrenérgicos produce una disminución de la densidad de la corriente mediada por canales *erg*, tanto en células HEK293 transfectadas, como en un sistema nativo de cardiomiocitos ventriculares de ratón. Se ha propuesto que esta regulación es debida precisamente al descenso del PIP<sub>2</sub> causado por la activación de la fosfolipasa C (PLC) (Bian y McDonald 2007).

### 1.1.7. Regulación hormonal de los canales *erg* por TRH.

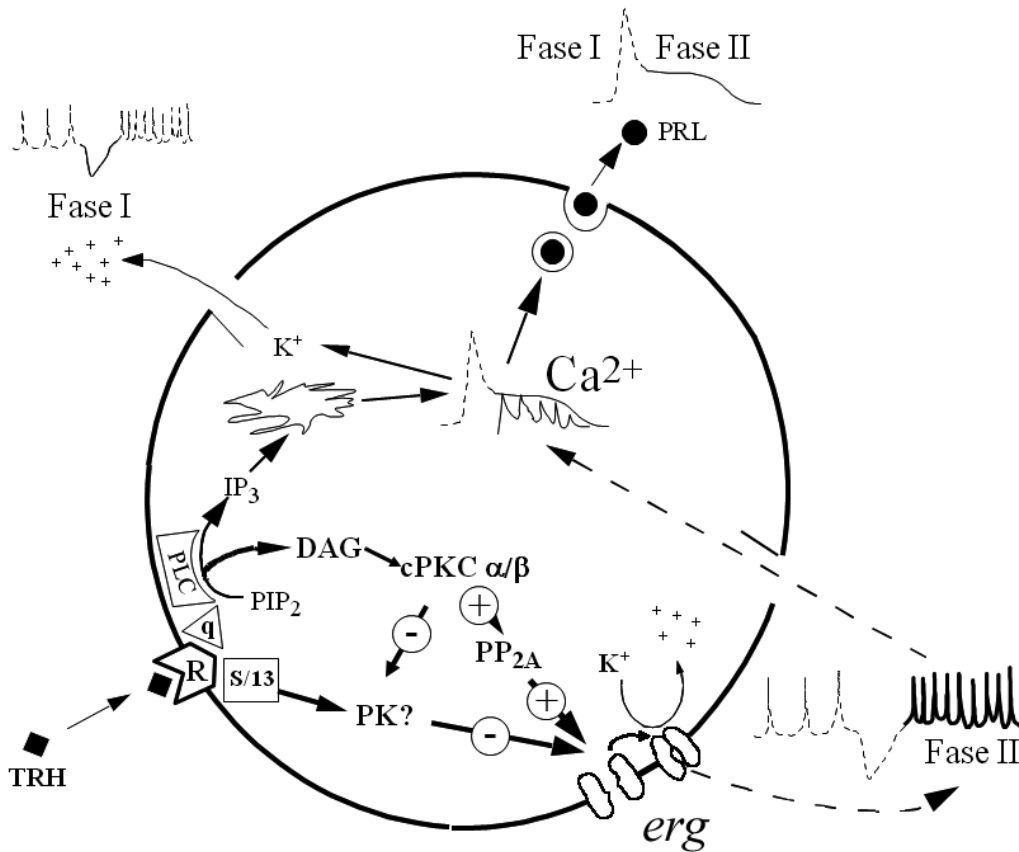
Quizá el sistema más estudiado y mejor conocido en cuanto a la regulación fisiológica de las canales *erg* sea el constituido por la hormona liberadora de tirotrópina o TRH y la línea de células adenohipofisarias GH<sub>3</sub>, derivada del cultivo primario de un tumor de hipófisis de rata, en la que se expresan de forma natural tanto el receptor de TRH como el canal rERG.

La TRH es un tripéptido (pyroGlu-His-Pro-NH<sub>2</sub>) que tiene un importante papel en la adenohipófisis, donde estimula la síntesis y secreción de prolactina (PRL) en células lactotrofas (Lamberts y MacLeod 1990), así como la liberación de tirotrópina (TSH, Hormona estimulante del tiroides) en células tirotrofas (Reichlin 1985). En la Figura 4 se muestra un esquema de los efectos y las rutas de actuación de la hormona TRH en las células GH<sub>3</sub> (Gómez-Varela *et al.* 2003b). Cuando la TRH se une a su receptor se desencadena una respuesta a la hormona que se manifiesta en dos fases. Por un lado se produce la activación de la PLC a través de una proteína  $G\alpha_q$  acoplada al receptor. Esta activación de PLC da lugar a un aumento de los niveles intracelulares de diacilglicerol (DAG) e inositol-1,4,5-trisfosfato (IP<sub>3</sub>) (Kiley *et al.* 1991). El IP<sub>3</sub> se une a sus receptores en la membrana de los orgánulos con almacenes intracelulares de Ca<sup>2+</sup> (como por ejemplo, el retículo endoplásmico), provocando un rápido aumento de los niveles citoplasmáticos del catión, el cual a su vez produce la activación de canales de K<sup>+</sup> dependientes

de  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana celular (Akita *et al.* 1994). La activación de estos canales da lugar a una salida de  $\text{K}^+$  al medio extracelular, lo cual se traduce en una hiperpolarización rápida y transitoria de la membrana celular durante la que la actividad eléctrica se detiene (Fase I). A continuación se produce la denominada Fase II de respuesta a la hormona, caracterizada por una notable disminución de una segunda corriente de  $\text{K}^+$ , mediada precisamente por canales rERG (Barros *et al.* 1992, 1993, 1994, 1996), y que conlleva un incremento de la frecuencia de producción de potenciales de acción. Dado que los potenciales de acción en estas células son de  $\text{Ca}^{2+}$ , ello produce un aumento en la entrada del catión desde el medio extracelular, que eleva los niveles del mismo en el citoplasma. Los incrementos del  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático durante las Fases I y II provocan a su vez un aumento en la secreción de PRL, inicialmente de forma rápida y transitoria en la Fase I (Ozawa y Sand 1986; Bjøro *et al.* 1990), tras lo cual los niveles de secreción permanecen tónicamente elevados en la Fase II en respuesta a la ya citada entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (Ozawa y Sand 1986; Bjøro *et al.* 1990; Villalobos y García-Sancho 1995).

Así pues, en las células GH<sub>3</sub> la Fase II de respuesta a la TRH se produce a través de una inhibición de entre un 70 y un 80 % de la corriente sensible al compuesto E-4031, un inhibidor específico de los canales *erg*. La eliminación de dicha inhibición cuando a las células se les suministra un análogo no hidrolizable del ATP (ADP-NH-P, incapaz de ceder el fosfato para reacciones de fosforilación), sugirió la implicación de un mecanismo de fosforilación en esta regulación (Barros *et al.* 1993). Aunque se ha descrito que la activación del receptor de TRH de las células GH<sub>3</sub> produce una activación transitoria de una PKC sensible a ésteres de forbol (Martin *et al.* 1990), se ha demostrado claramente que la inhibición de rERG por TRH es completamente independiente de la PKC y de la PKA (Bauer *et al.* 1990; Barros *et al.* 1992, 1993; Schäfer 1999; Schledermann 2001). En nuestro laboratorio se ha demostrado además que los efectos de la TRH sobre rERG son convertidos en irreversibles en presencia de inhibidores de proteína fosfatasas, y que dichos efectos pueden ser revertidos por la aplicación de la subunidad catalítica de la Proteína Fosfatasa 2a (PP<sub>2A</sub>) purificada, lo que refuerza la propuesta de que en el efecto hormonal debe haber implicado algún mecanismo de fosforilación (Barros *et al.* 1993). Posteriormente, y mediante el uso de compuestos inhibidores de PKC, se ha demostrado que en la reversión del efecto de la TRH sobre rERG en las células GH<sub>3</sub> parece participar no sólo la PP<sub>2A</sub>, sino incluso la propia PKC (Gómez-Varela *et al.* 2003b).

## 1. Introducción.



**Figura 4. Fases y mecanismos de respuesta a la TRH en células GH<sub>3</sub>.** Se representa esquemáticamente una célula GH<sub>3</sub> y las dos fases de respuesta a la TRH (ver texto). La Fase I se representa en la parte superior izquierda, mientras que la Fase II se muestra en la zona inferior derecha. En el exterior de la célula se muestran esquemáticamente registros de la actividad eléctrica, y en la parte central y superior derecha de la figura se representa el esquema de las oscilaciones del nivel de Ca<sup>2+</sup> interno de una célula, y de la elevación del Ca<sup>2+</sup> y secreción de PRL de una población celular. TRH, hormona liberadora de tiotropina; R, receptor; q, proteína Gq; PLC, fosfolipasa C; s, proteína Gs; 13, proteína G<sub>13</sub>; PIP<sub>2</sub>, fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato; DAG, diacilglicerol; IP<sub>3</sub>, inositol-1,4,5-trisfosfato; *erg*, canal de K<sup>+</sup> *ether-à-go-go* related gene; PRL, prolactina. PK, proteína quinasa; PP<sub>2A</sub>, proteína fosfatasa 2A; K<sub>Ca</sub>, canal de K<sup>+</sup> dependiente de Ca<sup>2+</sup>; VDCC, canal de Ca<sup>2+</sup> dependiente de voltaje. Modificado de Gómez-Varela *et al.* 2003b.

Por otra parte, el efecto inhibitorio ejercido por la TRH sobre rERG parece estar mediado por la activación de una proteína G cuya identidad resulta aún controvertida. La observación de que el efecto hormonal se modifica al tratar las células GH<sub>3</sub> con toxina del cólera (CTX) llevó a sugerir la participación de una proteína tipo G<sub>s</sub> (Barros *et al.* 1994; Bauer *et al.* 1994). Sin embargo, el hecho de que el efecto de la TRH se produzca sin un aumento apreciable del AMPc intracelular o de que la introducción de este nucleótido no altere la inhibición de la corriente inducida por la TRH en varios tipos celulares, ha llevado a algunos autores a proponer que la proteína G implicada en la regulación es una proteína sensible a CTX pero distinta a la G<sub>s</sub> (Bauer *et al.* 1994). Sin embargo, la implicación de una proteína G<sub>s</sub> en los efectos de TRH sobre el canal hERG, por la ruta de la PLC, ha sido demostrada posteriormente de forma directa en oocitos de *Xenopus* en nuestro laboratorio (de la Peña *et al.* 1995).

Se ha propuesto una vía alternativa para la regulación del canal rERG por la TRH en las células adenohipofisarias, que implicaría el acoplamiento del receptor a la proteína  $G_{13}$  y la participación adicional de la proteína G pequeña RhoA (Storey *et al.* 2002). Si bien se ha propuesto que en esta vía podría participar también la Rho-quinasa, ésta no parece estar implicada en la reducción de la corriente rERG inducida por la TRH en las células GH<sub>3</sub> (Gómez-Varela *et al.* 2003b). Posteriormente, utilizando dominantes negativos de diferentes transductores, en nuestro laboratorio se demostró que, mientras que el receptor de TRH utiliza la proteína  $G_q$  para la transducción de la señal de  $Ca^{2+}$  durante la respuesta inicial a la hormona, esta proteína no sólo no participa en la inhibición de rERG inducida por TRH, sino que parece ser una proteína tipo  $G_s$  y/o  $G_{13}$  la encargada de la transducción de la señal inhibitoria hasta los canales rERG. Además, nuestros datos han sugerido que probablemente son los dímeros  $\beta\gamma$  liberados de los heterotrímeros  $G_s$  o  $G_{13}$ , y no las subunidades  $\alpha$  correspondientes, los que participan en la señalización (Miranda *et al.* 2005).

Además de los descritos hasta ahora, la TRH produce otros efectos intracelulares que podrían estar implicados en la secreción a corto o largo plazo, como son la activación de la MAP quinasa ERK (extracellular-signal-regulated kinase) (Omichi *et al.* 1994; Palomero *et al.* 1998; Kanasaki *et al.* 1999), la producción de NO (Tsumori *et al.* 1999) o la liberación de ácido araquidónico (Judd *et al.* 1986). Si bien ya se ha mencionado la existencia de un mecanismo de regulación de hERG por NO (Taglialatela *et al.* 1999), así como de otros canales  $K_v$  por la ERK (Adams *et al.* 2000), ni el tratamiento con NO ni con un inhibidor de la quinasa MEK que activa ERK fueron capaces de bloquear la respuesta del rERG a TRH (Schledermann *et al.* 2001). Sin embargo, cabe destacar que en el caso de MEK las condiciones técnicas de estudio no fueron óptimas, ya que el inhibidor usado (PD98059) reducía de manera significativa la corriente de rERG de forma independiente del tratamiento con TRH (Schledermann *et al.* 2001).

En base a lo expuesto y otros datos respecto a la regulación de *erg*, si bien son varios los casos en los que sufre regulación hormonal demostrados en distintos tipos celulares, no parece existir una ruta de transducción o siquiera un elemento común por el que dicha regulación tenga lugar, y en todos esos casos permanecen aún por dilucidar algunos de los eventos moleculares implicados. De hecho, incluso en células GH<sub>3</sub> en las que ha sido bastante bien definida la vía de reversión del efecto inhibitorio causado por la TRH (Gómez-Varela *et al.* 2003b), no está del todo claro cuál es la proteína G implicada y aún menos la identidad de la hipotética quinasa involucrada en el efecto regulatorio directo. Tampoco conocemos por



## 1. Introducción.

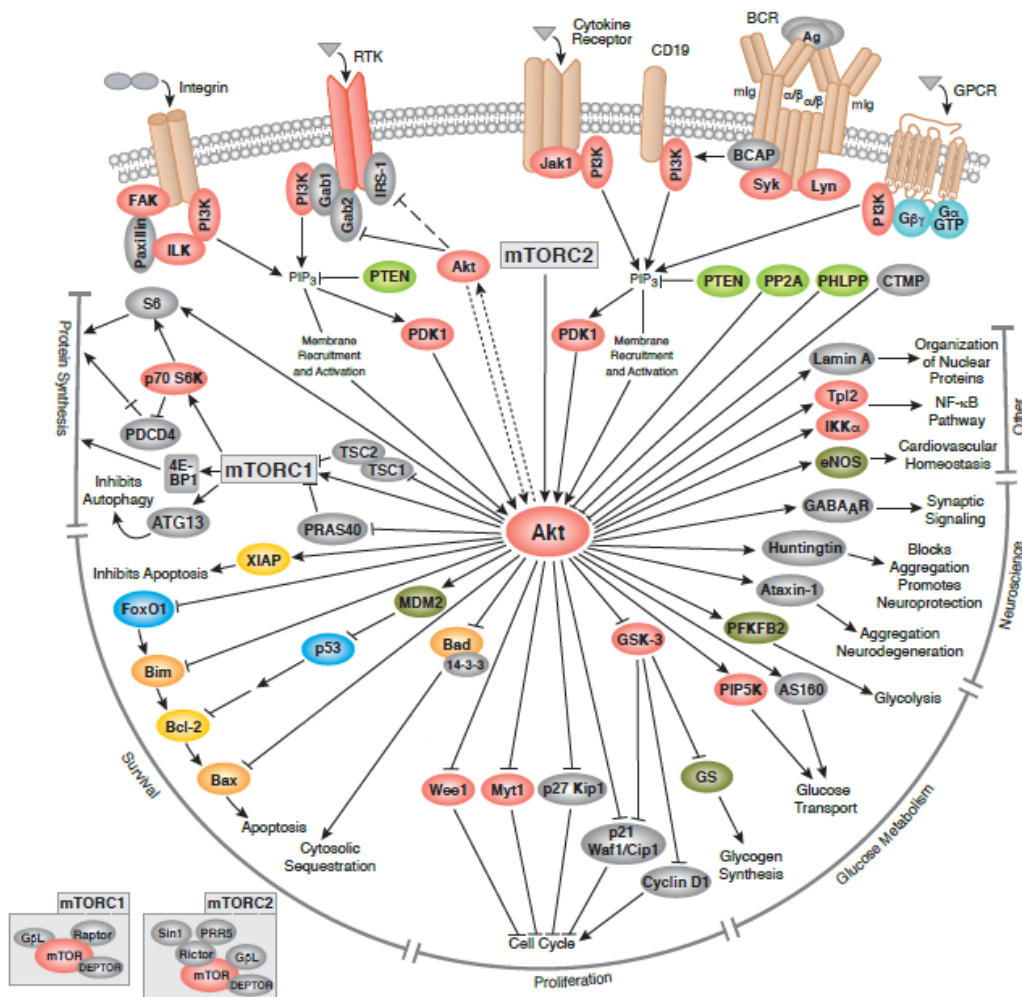
completo ni la naturaleza ni la posible ubicación dentro de la estructura del canal (o de otra proteína reguladora asociada con él) de las modificaciones inducidas por la hormona.

### 1.2. La proteína quinasa PKB/Akt.

La proteína quinasa Akt, también conocida como proteína quinasa B o PKB, es una quinasa de serina/treonina que pertenece a la superfamilia de las proteínas quinasas A, G y C (AGC). Todas ellas comparten homología estructural en su dominio catalítico y tienen un mecanismo de activación similar (Song *et al.* 2005; Sale y Sale 2008). En mamíferos hay tres genes de PKB/Akt muy relacionados entre sí, denominados PKB $\alpha$ /Akt1, PKB $\beta$ /Akt2 y PKB $\gamma$ /Akt3. El gen Akt1 se expresa en todos los tejidos, mientras Akt2 se expresa principalmente en tejidos con respuesta a insulina, como hígado, grasa marrón o músculo esquelético, y Akt3, de expresión ubicua, aunque expresado en bajos niveles en hígado y músculo esquelético (Bellacosta *et al.* 2004; Fayard *et al.* 2005). Las tres proteínas Akt tienen un dominio amino terminal PH (*pleckstrin homology*) (Auguin *et al.* 2004), un dominio proteína quinasa central y una cola hidrofóbica en el extremo carboxilo terminal (Song *et al.* 2005). Han sido obtenidas varias estructuras cristalográficas del dominio PH y de la región catalítica central (Kumar y Madison 2005). El dominio PH comprende unos 100 residuos aminoacídicos (del 5 al 108 en Akt1) y es capaz de interactuar con fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP<sub>3</sub>) y fosfatidilinositol-3,4-bifosfato (PI(3,4)P<sub>2</sub>) con alta afinidad. El dominio quinasa es de aproximadamente 250 residuos de longitud, y es muy similar a los dominios catalíticos de otras quinasas como PKC, PKA o SGK (Thomas *et al.* 2002). Este dominio contiene una treonina conservada cuya fosforilación es necesaria para la activación completa del enzima (T308 en Akt1). El dominio carboxilo-terminal de aproximadamente 40 residuos contiene un motivo hidrofóbico característico de las quinasas AGC (F-X-X-F/Y-S/T-Y/F). Una serina muy conservada en esta región debe ser también fosforilada para la activación total de Akt (Thomas *et al.* 2002).

La ruta general de activación de Akt (ver Figura 4) comienza a partir de la activación de la PI3 quinasa (PI3K) por una tirosina quinasa o por un receptor de membrana acoplado a proteínas G (Alessi *et al.* 1996a). Cuando la PI3K está activa actúa sobre el PIP<sub>2</sub>, dando PIP<sub>3</sub>. Mediante la unión de su dominio PH con el PIP<sub>3</sub> Akt se sitúa en la membrana, donde es fosforilada en la T308 situada en el "lazo de activación" por la quinasa PDK1 (Alessi *et al.* 1997), tras lo cual es de nuevo fosforilada en la S473 por PDK2, un grupo de quinasas para el que se han propuesto hasta diez proteínas diferentes (Dong y Liu 2005) entre las que destaca mTORC2 (Sarbasov *et al.* 2005). La fosforilación de Akt en T308 y S473 conduce a su completa activación

(Alessi *et al.* 1996a; Song *et al.* 2005). Se han realizado experimentos de mutación dirigida sustituyendo la serina y o treonina de estos dos sitios de activación por el aminoácido no fosforilable alanina, observándose que el cambio en uno de los dos sitios disminuye la activación de Akt, y que resulta prácticamente bloqueada al sustituir ambos. Por el contrario, al sustituir estos dos sitios de activación por el aminoácido “fosfomimético” ácido glutámico se obtiene una forma de Akt constitutivamente activa. Todo ello demuestra la importancia de estas dos fosforilaciones en el mecanismo de activación de Akt (Manning y Cantley 2007). Aunque éste es el mecanismo normal de activación, en algunos trabajos se ha apuntado una vía de activación independiente de PI3K, donde agentes que aumentan los niveles de AMPc como forskolina, clorofeniltio-AMPC, prostaglandina-E1 y 8-bromo-AMPC serían capaces de activar Akt mediante la PKA, aunque el mecanismo de esta interacción aún no está claro (Song *et al.* 2005).



**Figura 5. Rutas de activación de PKB/Akt.** En la figura se muestran las distintas rutas de activación de Akt descritas desde receptores de integrinas, receptores con actividad tirosin quinasa (RTK), receptores de citoquinas, CD19, BCR y receptores transmembrana acoplados a proteínas G. Imagen mostrada con el permiso de Cell Signaling Technology, Inc. ([www.cellsignal.com](http://www.cellsignal.com)).

## 1. Introducción.

El primer sustrato celular de Akt identificado fue la Glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3) (Cross *et al.* 1995). Partiendo de esta proteína y realizando experimentos con péptidos que contenían variaciones de su secuencia, se consiguió identificar el motivo mínimo de reconocimiento de Akt R-X-R-X-X-S/T-B (Alessi *et al.* 1996b), donde X representa a cualquier aminoácido y B representa un residuo hidrofóbico voluminoso. El requerimiento crítico de dos argininas en las posiciones -3 y -5 respecto a la Ser/Thr del sitio de fosforilación distingue la especificidad de sustrato de Akt de la de otras dos quinasas AGC estimuladas por mitógenos, RSK (MAPKAP-K1) y S6K1 (p70S6K). Las características moleculares de las interacciones que marcan la selectividad de sustrato de Akt han sido mostradas mediante la estructura cristalina de la molécula de Akt unida a su péptido sustrato de GSK3 (Yang *et al.* 2002).

La quinasa Akt tiene un papel central en la transducción de señales de muchos procesos celulares, entre ellos la homeostasis de la glucosa por parte de la insulina, el crecimiento celular, la angiogénesis, la progresión de tumores y la supervivencia celular (Jiang *et al.* 2003; Katome *et al.* 2003; Song *et al.* 2005; Noske *et al.* 2006; Manning y Cantley 2007). Muchos de estos procesos están regulados por hormonas, bien acopladas a señalización por tirosina quinasas como NGF, EGF, PDGF, IGF, o la propia insulina (Dohoon y Jongkyeong 2002; Hu *et al.* 2005; Sale y Sale 2008), o bien mediadas por receptores acoplados a proteínas G, a través de rutas donde interviene PI3K y donde parece que podrían estar implicados los dímeros  $\beta\gamma$  de las proteínas G asociadas al receptor (Montaner 2007).

Por otra parte, y en relación con los objetivos de este trabajo, ya se ha mencionado que Akt ha sido implicada en la regulación del canal hERG expresado en células HEK293, pues el bloqueo de su activación mediante wortmanina (un inhibidor de la PI3K) o por el uso de dominantes negativos de Akt, causa una disminución de la densidad de las corrientes transportadas por el canal, mientras que una sobreexpresión de Akt las aumenta (Zhang *et al.* 2003). En nuestro laboratorio se ha demostrado que en células GH<sub>3</sub> el tratamiento con wortmanina no produce ningún efecto sobre la respuesta a TRH por parte del canal (Gómez-Varela *et al.* 2003b), pero, como en algunos casos Akt puede activarse de forma independiente de PI3K (Song *et al.* 2005), nos pareció conveniente estudiar el efecto de un bloqueo directo de su actividad. Dado que para tratar de discernir el papel que ocupa esta quinasa en diferentes rutas de señalización se ha utilizado su silenciamiento mediante siRNAs (Jiang *et al.* 2003; Katome *et al.* 2003; Noske *et al.* 2006; Liang *et al.* 2009), pensamos que ésta podría ser una buena herramienta para comprobar su posible implicación en la regulación de los canales *erg*.

### **1.3. La proteína quinasa del dominio PAS, PASK.**

La proteína quinasa del dominio PAS (Per-ARNT-Sim), llamada PAS quinasa, PASKIN o PASK, contiene dos dominios PAS (PAS A y PAS B) y un dominio serina/treonina quinasa (Schlähfli *et al.* 2009). El nombre del dominio PAS es un acrónimo de las tres primeras proteínas en las que se identificó el mismo, los factores de transcripción de *Drosophila* Per, ARNT y Sim (Schlähfli *et al.* 2009). Los dominios PAS contienen cinco láminas  $\beta$  antiparalelas flanqueadas por dos hélices  $\alpha$ , y el papel fundamental de este dominio es el de conferir la capacidad de interaccionar con dominios PAS de otras proteínas (Schlähfli *et al.* 2009). También se ha visto que, dada su peculiar estructura tridimensional, puede albergar pequeñas moléculas como ligandos, como sucede en el caso del factor de transcripción neuronal NPAS2, en el que cada uno de sus dominios PAS está coordinado con un grupo hemo que une monóxido de carbono (Dioum *et al.* 2002). En la molécula de PASK se ha descrito la existencia de procesos de autofosforilación en *trans* en los residuos T1161 y T1165 de los dominios PAS. Sin embargo esta autofosforilación está inhibida en condiciones basales por el propio dominio PAS A de PASK. La unión de un ligando específico al dominio PAS provocaría una desinhibición de la actividad auto-quinasa y por tanto la fosforilación de esos residuos de treonina (Rutter *et al.* 2001). Aunque se creyó que esta autofosforilación servía como mecanismo de activación de la serina/treonina quinasa de PASK, recientemente se ha visto que la actividad quinasa es independiente de su autofosforilación, por lo que el papel que pueda tener ésta aún debe ser elucidado (Kikani *et al.* 2010).

En mamíferos se han identificado varios sustratos de esta actividad quinasa. Así, PASK inactiva la Glucógeno sintasa por fosforilación en la serina 640, también fosforila al eEF1A1 en la treonina 432 posiblemente aumentando su actividad, y más recientemente se identificó como sustrato a la proteína ribosomal S6, que es fosforilada por PASK en las serinas 235/236 (Wilson *et al.* 2005; Eckhardt *et al.* 2007; Schlähfli *et al.* 2011). La actividad serina/treonina quinasa de PASK parece estar influenciada por la unión de fosfatidil inosítoles, resultando aumentada en el caso de la interacción con fosfatidil inosítoles monofosfato y reducida en el caso de fosfatidil inosítoles bi- y tri-fosfato. Hay que hacer notar que la interacción con estos inosítoles no tiene lugar mediante el dominio PAS sino mediante el dominio serina/treonina quinasa. Por tanto, el papel de la posible unión de ligandos al dominio PAS de PASK permanece aún desconocido (Schlähfli *et al.* 2011).

## 1. Introducción.

Utilizando un estudio de microarrays con posibles péptidos aceptores de la fosforilación por PASK, se observó un aumento en la fosforilación de péptidos de la proteína de hERG; no obstante esos resultados no fueron concluyentes, por lo que esta fosforilación aún debe ser confirmada (Schläfli *et al.* 2011). Dado que, como explicamos previamente, el dominio PAS de hERG es fundamental en la funcionalidad normal del canal y que se ha descrito que mutaciones en él afectan a su actividad (Morais-Cabral *et al.* 1998; Chen *et al.* 1999), parece pertinente tanto el estudio de la posible fosforilación del dominio mediada por PASK, como el de la posible implicación de esta quinasa en los mecanismos de regulación de hERG.

### **1.4. La proteína quinasa regulada por señales extracelulares ERK.**

Las proteína quinasas activadas por mitógenos (MAPK) son quinasas de serina/treonina que convierten estímulos extracelulares o señales de transducción en una amplia gama de respuestas. Las MAPKs se encuentran entre las más antiguas rutas de transducción de señales identificadas y han sido ampliamente usadas a lo largo de la evolución para la regulación de muchos procesos celulares y fisiológicos (Widmann *et al.* 1999), incluyendo expresión génica, mitosis, metabolismo, movimiento, supervivencia, apoptosis y diferenciación. En mamíferos se han identificado catorce MAPKs que se han caracterizado y clasificado en siete grupos. Las MAPKs convencionales comprenden a las quinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK 1/2), las quinasas *c-Jun amino-terminal* 1/2/3 (JNK1/2/3), las isoformas de p38 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ), y ERK 5 (Pearson *et al.* 2001; Chen *et al.* 2001; Cargnello y Roux 2011). Las MAPKs atípicas tienen diferentes particularidades y comprenden a las ERK 3/4, ERK 7 y a la quinasa tipo Nemo (NLK) (Coulombe y Meloche 2007; Cargnello y Roux 2011).

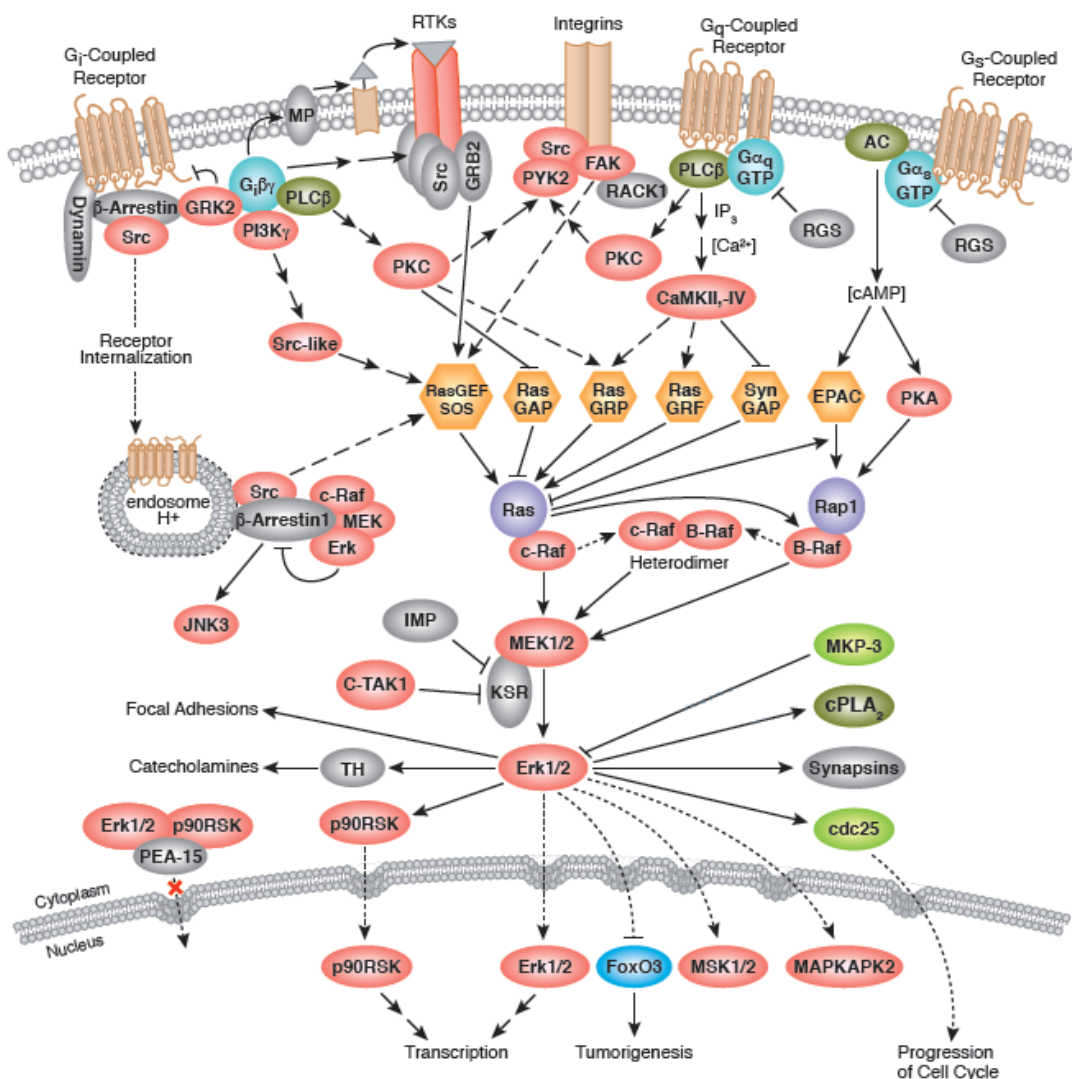
En este trabajo nos hemos centrado en el estudio de la posible implicación en nuestro estudio de ERK1 y ERK2, las primeras MAPK identificadas y caracterizadas, y las más estudiadas hasta la fecha. Fueron descubiertas por primera vez en 1987 como una actividad proteína quinasa que fosforilaba a la proteína asociada a microtúbulos 2 en respuesta a insulina, y que posteriormente fue asociada con las proteínas ERK1 y ERK2 (Ray y Sturgill 1987; Boulton *et al.* 1990, 1991). Las ERK1 y ERK2 humanas son proteínas de 43 y 41 kDa respectivamente, que comparten un 83 % de identidad entre ellas. Al igual que para el resto de MAPKs convencionales, la cascada de activación del grupo de las ERK1/2 está compuesta por un módulo de tres quinasas secuenciales: una MAPK, activada por una MAPK quinasa (MAPKK), y ésta por una MAPKK quinasa (MAPKKK) (Raman *et al.* 2007).

El mecanismo general de activación del módulo ERK1/2 comienza con la fosforilación de la MAPKK, principalmente por una proteína Raf, aunque, en función del tipo celular y en respuesta a diferentes estímulos, pueden actuar también como MAPKKK las quinasas MEKK1, Mos (en oocitos de *Xenopus*) y Tpl2 (Raman *et al.* 2007). Esta fosforilación ocurre como resultado de la interacción de la MAPKKK con una proteína pequeña de unión a GTP de la familia Ras/Rho en respuesta a un estímulo extracelular. La MAPKKK activada fosforila a su vez a las MAPKK MEK1 y/o MEK2 activándolas, y éstas estimulan la actividad de ERK1 y ERK2 mediante una fosforilación dual en residuos de treonina y tirosina de un sitio Thr-X-Tyr altamente conservado que se encuentra en el lazo de activación del dominio quinasa de la MAPK (Robbins *et al.* 1993; Dhillon *et al.* 2007; Raman *et al.* 2007; Cargnello y Roux 2011). ERK1/2 activada es capaz de fosforilar sus sustratos en serinas o treoninas seguidas por una prolina, por lo que son quinasas de serina/treonina dirigidas por prolina. Además de la secuencia del sitio de fosforilación, la selectividad de sustrato de las MAPKs es conferida por dominios de interacción presentes en la proteína, llamados sitios de acoplamiento o *docking sites* (Jacobs *et al.* 1999; Sharrocks *et al.* 2000; Zhou *et al.* 2006). En la regulación de la acción de las MAPKs también influyen diversas proteínas adaptadoras o *scaffolds*, sobre las que se ensamblan los diferentes componentes de las cascadas de señalización, permitiendo tanto una eficiente fosforilación como especificidad de activación de las rutas en función de los componentes ensamblados. Esta proximidad entre los diferentes componentes del sistema de transducción permite además integrar la señalización de estímulos externos en microambientes determinados (Elion 2001; Kolch 2005). Algunos de los principales sustratos de ERK1/2 son proteína quinasas como la quinasa p90 ribosomal S6 (RSK), la quinasa activada por mitógenos y estrés (MSK) o la quinasa de interacción con MAPK (MNK), así como los factores de transcripción Elk-1, c-Fos y c-Myc, entre muchos otros (Raman *et al.* 2007; Cargnello y Roux 2011).

La ruta más conocida y mejor caracterizada de activación de MAPK es la que se origina por estimulación de receptores transmembrana con actividad tirosina quinasa (ver Figura 6), entre los cuales se encuentran receptores de factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptores de insulina y muchos otros (Cargnello y Roux 2011; Steelman *et al.* 2011). La unión del ligando a estos receptores induce su dimerización, que permite la autofosforilación del receptor en residuos de tirosina del dominio intracelular, obteniéndose así su activación (Lemmon y Schlessinger 2010). Estos residuos fosforilados sirven

## 1. Introducción.

como sitio de unión para las proteínas adaptadoras Shc, que reclutan otras proteínas adaptadoras como Grb2, las cuales a su vez interactúan con la proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina Sos 1/2. La formación del complejo Shc/Grb2/Sos en la membrana favorece el intercambio de GDP por GTP en la proteína G pequeña Ras, lo cual resulta en su activación y en un aumento en su afinidad por las serina/treonina quinasas de la familia de Raf (A-, B- y C-Raf), induciendo su translocación a la membrana. La activación de Raf por Ras tiene lugar mediante un complicado proceso multi-etapa en el que tiene lugar la formación de homodímeros y heterodímeros (Roskoski Jr. 2010). Raf tiene una especificidad de sustrato restringida, catalizando la fosforilación y activación de MEK1 y MEK2, que a su vez activan a las quinasas ERK1 y ERK2 mediante la fosforilación en treonina y tirosina (Roskoski Jr. 2012).



**Figura 6. Rutas de activación de las MAPKs ERK1 y ERK2 por receptores transmembrana.** En la figura se muestran las distintas rutas de activación de ERK1/2 desde receptores transmembrana acoplados a proteínas G tipo Gi, Gq y Gs, desde receptores con actividad tirosín quinasa (RTKs) y desde receptores de integrinas. Imagen tomada con licencia de Cell Signaling Technology, Inc. ([www.cellsignal.com](http://www.cellsignal.com)).

### 1.4.1. Activación de ERK por receptores acoplados a proteínas G.

Aparte de esta ruta de activación que acabamos de detallar, también es posible la activación de ERK1/2 por receptores de siete hélices transmembrana acoplados a proteínas G (GPCR). Dada la gran cantidad de moléculas efectoras cuya señalización está mediada por proteínas G hay múltiples vías que pueden producir la activación de ERK1/2, en función del tipo de proteína G al que esté acoplado el receptor y del tipo celular en que se produzca (Figura 6), ya que éste va a determinar la maquinaria de señalización disponible. Además, hay que considerar que estos receptores acoplados a proteínas G van a provocar la liberación tanto de subunidades  $G_\alpha$  como de dímeros  $G_{\beta\gamma}$ , y en ambos casos se puede iniciar una secuencia de acontecimientos que conduzcan a la activación de ERK1/2 (Goldsmith y Dhanasekaran 2007). A continuación se presentan resumidas las posibles vías de regulación de ERK por GPCR acoplados a proteínas  $G_s$ ,  $G_i$  y  $G_q$ , que se ilustran en la Figura 6.

La activación de ERK1/2 mediada por  $G_{\alpha_s}$  se produce de forma dependiente o independiente de PKA en función del tipo celular. En este caso las proteínas  $G_s$  estimuladas por el receptor liberan la subunidad  $G_{\alpha_s}$ , que activa la adenilato ciclasa, la cual convierte el ATP en AMPc, y éste provoca la activación de la PKA. La PKA media la fosforilación de C-Raf en la serina 259, lo cual resulta en su inhibición y por tanto en el bloqueo de la subsiguiente activación de MEK1/2 y ERK 1/2 (Dhillon *et al.* 2002). Pero además de este efecto inhibitorio, la  $G_{\alpha_s}$  también activa ERK1/2 actuando sobre la MAPKKK B-Raf. Este proceso puede tener lugar mediante la activación dependiente de AMPc de la proteína EPAC, un intercambiador de nucleótidos de guanina que provoca la entrada de GDP por GTP en la proteína Rap1 (MAPKKKK), la cual se activa y fosforila B-Raf activando la cascada de activación de ERK1/2 (Laroche-Joubert *et al.* 2002). Por otro lado,  $G_{\alpha_s}$  también puede actuar sobre Rap1 por la vía de PKA, pues ésta fosforila Src, que forma un complejo multi-proteico facilitador del intercambio de GDP por GTP en Rap-1, que fosforila B-Raf activando el módulo de ERK1/2 (Weissman *et al.* 2002).

En el caso de las proteínas de la familia  $G_i$ , tanto la subunidad  $G_{\alpha_i}$  como los dímeros  $\beta\gamma$  median la activación de ERK1/2 a través de diversos mecanismos. La activación de ERK1/2 mediada por  $G_{\alpha_i}$  involucra la supresión de dos rutas de inhibición. Por un lado,  $G_{\alpha_i}$  disminuye la actividad adenilato ciclasa con la consiguiente inhibición de PKA, lo cual reduce la inhibición mediada por ésta de la actividad de C-Raf (Radhika y Dhanasekaran 2001). Por otro lado,  $G_{\alpha_i}$  secuestra a la proteína Rap-1 GAPII, una GTPasa que tiene un efecto inhibitorio sobre Rap-1 (Mochizuki *et al.* 1999). Respecto a la activación de ERK1/2 mediada por los dímeros  $\beta\gamma$ , varía



## 1. Introducción.

en función del estímulo extracelular y el tipo celular estudiado. Así, en estudios de receptores  $\alpha_{2A}$ -adrenérgicos en células COS-7 y HEK293 transfectadas, los dímeros  $\beta\gamma$  aumentan la actividad de la PLC $\beta$ , lo que desemboca en un aumento del calcio intracelular y la activación mediada por  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulina de la quinasa Pyk2. A su vez, ésta activa a Src, lo que conlleva una activación de la proteína adaptadora Shc y la activación de Ras (Della Roca *et al.* 1997). Sin embargo, los dímeros  $\beta\gamma$  liberados por los receptores de LPA (ácido lisofosfatídico) o trombina (ambos acoplados a  $G_i$ ) activan ERK1/2 por una vía que involucra PI3K y la formación de un complejo dinamina II-Grb2, con la resultante activación de Ras (Kranenburg *et al.* 1999).

La subunidad  $G\alpha_q$  es capaz de activar ERK1/2 por la vía de la PLC y el DAG, que producen la activación de PKC, la cual activa a C-Raf por fosforilación directa (Schonwasser *et al.* 1998). Otro mecanismo alternativo es mediante la activación de PLC, liberación de  $\text{IP}_3$  y aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, que permite la activación de Pyk2 mediada por  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulina y la subsiguiente activación de Ras y el módulo de ERK1/2 (Della Rocca *et al.* 1997). Además de estas dos vías típicas de actuación de  $G\alpha_q$ , también existe un tercer mecanismo que involucra a una Rap-1 GEF dependiente tanto de DAG como de  $\text{Ca}^{2+}$ , la cual activa ERK1/2 desde B-Raf (Guo *et al.* 2001). Es decir, la regulación de ERK1/2 por  $G\alpha_q$  tiene lugar por tres mecanismos diferentes, que no tienen por qué ser excluyentes entre sí, dado que la activación de  $G_q$  desemboca en la generación tanto de DAG como de  $\text{IP}_3$ . Además, dado que los dímeros  $\beta\gamma$  pueden también estimular la actividad de la PLC $\beta$ , pueden contribuir a la activación de ERK1/2 por un mecanismo similar al descrito para  $G_i$ . En algunos contextos celulares, los dímeros  $\beta\gamma$  disociados de proteínas  $G_q$  pueden asimismo activar ERK1/2 mediante transactivación de receptores tirosina quinasa (Zhong *et al.* 2003).

### 1.4.2. Activación de ERK por transactivación de receptores tirosina quinasa.

Además de todas estas vías de señalización, los receptores de membrana acoplados a proteínas G, principalmente los acoplados a  $G_q$  y  $G_i$ , también pueden activar el módulo ERK1/2 mediante transactivación de receptores tirosina quinasa (Figura 6). De hecho, se ha visto que el receptor de EGF juega un papel determinante en la activación de ERK en múltiples tipos celulares. La transactivación de EGFR por GPCRs involucra tanto procesos intracelulares como extracelulares, requiriendo un aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y la activación de PKC, Src y Pyk2 (Iwasaki *et al.* 1999; Gschwind *et al.* 2001). Estas rutas convergen en la activación por fosforilación de una metaloproteasa de la familia de las ADAM y/o de las MMP. Estas metaloproteasas cortan y liberan los ectodominios de unión a membrana de ligandos de

EGFR como HB-EGF, de modo que se generan ligandos tipo EGF solubles que pueden activar al EGFR (Ohtsu *et al.* 2006). También se ha visto que la señalización hacia ERK por receptores tirosina quinasa puede estar aumentada por proteínas G a través de un mecanismo de internalización endocítica tanto del GPCR activado como de c-Src, PDGFR, las quinasas del módulo de ERK y Grb-2, siendo esta endocitosis facilitada por  $\beta$ -arrestina y dinamina II. La proximidad de todos los efectores dentro del endosoma y la activación de Raf-1 por Src causaría la activación del módulo de ERK (Waters *et al.* 2005).

### **1.4.3. Activación de ERK por TRH.**

En lo referente al trabajo que nos ocupa, tanto en nuestro laboratorio como en otros se ha descrito la activación de ERK por TRH en varios tipos celulares (Omichi *et al.* 1994; Palomero *et al.* 1998; Kanasaki *et al.* 1999). En el caso específico de las células GH<sub>3</sub>, se ha comprobado que la activación de ERK inducida por TRH tiene lugar por dos vías diferentes: una dependiente de PKC por fosforilación de C-Raf, y otra independiente de esta quinasa en la que estarían implicados los dímeros  $\beta\gamma$  y la proteína Ras con la consiguiente activación de C-Raf y MEK 1/2. Asimismo se ha visto en células CHO que el efecto activador de ERK1/2 por los dímeros  $\beta\gamma$  en respuesta a TRH no está mediado por la fosforilación del receptor de EGF (Palomero *et al.* 1998; Palomero 1999, Tesis Doctoral) y que en células HEK293 no necesita la interacción del TRHR con la  $\beta$ -arrestina o la endocitosis del mismo (Smith *et al.* 2001).

## **1.5 Técnicas de RNAi y espectrometría de masas.**

### **1.5.1 Interferencia de RNA.**

La interferencia de RNA (RNAi) es un proceso de bloqueo específico de la expresión génica mediado por RNA de doble cadena (dsRNA), que se manifiesta mediante múltiples respuestas basadas en la homología de secuencia, llamadas colectivamente silenciamiento por RNA. Estas respuestas pueden consistir no sólo en la degradación de mRNAs y dsRNAs, sino también en la regulación o bloqueo de la transcripción y de la traducción, y en el control de la estructura de la cromatina y la integridad genómica, además de poder actuar como mecanismo de defensa frente a virus de RNA y transposones (Hannon 2002; Meister y Thomas 2004; Baulcombe 2005; Valencia-Sánchez *et al.* 2006).

Dentro de la célula el dsRNA que dispare la respuesta de RNAi puede originarse de diferentes maneras: por hibridación de RNA repetitivo sobre sí mismo, por la expresión de

## 1. Introducción.

genes con regiones palindrómicas que se pliegan sobre sí mismas, o mediante la introducción *in vitro* de una secuencia de dsRNA exógena (Tomari y Zamore 2005). El proceso de silenciamiento puede variar en algunos pasos, pero el mecanismo general es similar. Los siRNAs (*small interfering RNAs*) son producidos a partir del procesamiento por la endonucleasa Dicer de una secuencia citoplásmica de dsRNA de mayor tamaño de origen endógeno o exógeno. El procesamiento por Dicer da lugar a fragmentos de 21 pares de bases que se acoplan al complejo RISC, el cual es el efector del silenciamiento por RNA (Baulcombe 2005; Valencia-Sánchez *et al.* 2006). Este acoplamiento también tiene lugar cuando los siRNAs son producidos de forma exógena y transfectados a las células, como se hace habitualmente en el laboratorio para bloquear la expresión de genes diana.

La aplicación de la RNAi en mamíferos se ha orientado sobre todo a la inactivación específica de genes para el estudio de su función, a la obtención de ratones transgénicos y a la inactivación terapéutica de genes, oncogenes y virus de RNA (Baulcombe 2005; Moffat y Sabatini 2006; Ambesajir *et al.* 2012; Kubowicz *et al.* 2013). Habitualmente, el uso de las técnicas de RNAi en células de mamífero no suele permitir procesos de inactivación génica total, sino como mucho disminuciones del orden del 90-95 % en los niveles de expresión del gen diana (*knock-down*), considerándose técnicamente aceptables inactivaciones en torno al 80 %. Para el bloqueo de la expresión de genes diana mediante el silenciamiento de RNA en condiciones de laboratorio se han desarrollado diferentes estrategias. Las más usadas son la adición directa de siRNAs mediante transfección, y el uso de vectores plasmídicos o virales (en especial lentivirus) de expresión de siRNAs. Nosotros hemos optado por la primera de estas estrategias, pues es más sencilla metodológicamente y resulta adecuada cuando se trata de estudios iniciales para identificar los efectos de la pérdida de función de varias posibles proteínas diana (Moffat y Sabatini 2006).

La obtención de siRNAs para su transfección puede realizarse mediante la digestión con el enzima Dicer de una secuencia de dsRNA obtenida a partir del cDNA del gen a silenciar, lo que origina una mezcla aleatoria de siRNAs de 21 pb complementarios al mRNA objetivo del silenciamiento. Este abordaje permite la obtención de forma rápida y barata de mezclas de siRNAs con alta probabilidad de éxito para *screenings* o estudios previos de función. Sin embargo, estas mezclas pueden dar problemas técnicos generando posibles efectos inespecíficos, dado que, al usar como material de partida secuencias de una zona amplia del cDNA, no se puede descartar que alguno de los siRNAs producidos mediante el corte múltiple con Dicer tenga homología con el mRNA de otro gen, especialmente con alguno relacionado.

Para evitar estos problemas se utilizan siRNAs (habitualmente mezclas de tres o cuatro) diseñados específicamente mediante algoritmos de selección como los de Reynolds, Amarzguioui y Prydz, o Huesken (Reynolds *et al.* 2004; Amarzguioui y Prydz 2004; Huesken *et al.* 2005; Amarzguioui *et al.* 2006), de modo que se consiga el máximo silenciamiento utilizando uno o pocos siRNAs con secuencias específicas para el gen diana. El problema de los siRNAs de diseño propio es que no se puede asegurar su efectividad, y es necesario verificarla experimentalmente. Por otro lado, cada vez hay más genes para los que existen siRNAs comerciales garantizados, de forma que los únicos problemas con ellos son su existencia efectiva y su coste.

### 1.5.2 Espectrometría de masas.

La espectrometría de masas es una técnica analítica que se usa para determinar y medir iones en estado gaseoso con diferente relación carga/masa ( $m/z$ ;  $m$  = peso molecular del ion,  $z$  = carga del ion). Esta técnica es ampliamente utilizada en multitud de aplicaciones, como la identificación de compuestos, determinación de la composición química o el análisis cuantitativo y el estudio de diversas propiedades físicas, químicas o biológicas de analitos.

Los espectrómetros de masas están compuestos por una fuente de ionización que produce iones gaseosos, un analizador en el cual estos iones son separados y un detector que registra estos iones y almacena los datos en un equipo informático. En este trabajo hemos utilizado dos tipos de espectrómetros de masas: el MALDI-ToF, que nos permite obtener la relación  $m/z$  de los fragmentos peptídicos generados a partir de una digestión trípica de una proteína, y el LTQ-Orbitrap XL, que es un doble espectrómetro de masas en el cual la muestra pasa por dos etapas de adquisición de datos con lo que se consigue información extra sobre la secuencia de los péptidos generados tras la digestión de la proteína. Mediante este segundo equipo hemos utilizado técnicas de fosfoproteómica cuantitativa sin etiquetas ("*label free*") que nos permiten una cuantificación mediante la comparación de los espectros obtenidos con muestras control y tras la respuesta al estímulo en estudio (Cutillas y Vanhaesebroeck 2007; Casado y Cutillas 2011). Estas técnicas de proteómica cuantitativa son ampliamente utilizadas en el estudio de señalización celular y rutas metabólicas (Beltrán y Cutillas 2013).

## *1. Introducción.*

## **2. Objetivos.**

## 2. *Objetivos.*

El objetivo general perseguido en este trabajo ha sido avanzar en el conocimiento de los mecanismos y los componentes moleculares implicados en la regulación hormonal de los canales *erg* por la TRH. Para ello, se han planteado los siguientes objetivos:

- 1- Realizar un estudio comparativo de las Fases I y II de la respuesta a la hormona TRH en células GH<sub>3</sub> y HEK-H36/T1, para averiguar si las diferencias existentes se deben o no a la sobre-expresión del receptor de TRH en células HEK-H36/T1, y estudiar la implicación de los dímeros  $\beta\gamma$  de proteínas G en la modulación de los canales *erg* por dicha hormona en los dos tipos celulares.
- 2- Investigar la posible implicación de las quinasas Akt, PASK y ERK1/2 en la ruta de señalización entre el receptor de TRH y los canales *erg* tanto en células GH<sub>3</sub> como en HEK-H36/T1, utilizando para ello el silenciamiento de estas quinasas mediante interferencia de RNA e inhibidores de su fosforilación/activación, y estudiando su efecto en los parámetros electrofisiológicos de los canales modulados por TRH.
- 3- Obtener los perfiles fosfoproteómicos de las células GH<sub>3</sub> y HEK-H36/T1, y buscar los cambios inducidos en sus fosfoproteomas por el tratamiento con la hormona TRH, con el fin de identificar proteínas cuya fosforilación pueda estar implicada en los procesos de regulación de los canales *erg* por TRH.
- 4- Estudiar los canales *erg* a nivel molecular mediante técnicas proteómicas, para tratar de detectar interacciones con otras proteínas y de definir su estado y sitios de fosforilación, así como los posibles cambios en ellos en respuesta a TRH.
- 5- Estudiar el efecto que muestran las mutaciones en los sitios de fosforilación de los canales hERG sobre sus características cinéticas basales y sobre su respuesta a TRH.



## 2. *Objetivos.*

### **3. Materiales y métodos.**

### 3. *Materiales y métodos.*

### 3.1. Materiales.

#### 3.1.1. Tampones y disoluciones.

- TBE: Tris-HCl 50 mM, ácido bórico 50 mM y EDTA 1 mM pH 8,0.
- TE: Tris-HCl 10 mM pH 7,4; Na<sub>2</sub>EDTA 1 mM.
- PBS: NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1 mM pH 7,5.
- Tampón RIPA: Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Tritón X-100 1 %, Deoxicolato sódico 0,5 %, SDS 0,1 % y cóctel de inhibidores de proteasas Complete Mini (Roche).
- Tampón de lisis para inmunoprecipitación: Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1mM, CHAPS 0,3 %, se añade el cóctel de inhibidores de proteasas Complete Mini (Roche) e inhibidores de fosfatasas Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, NaF 1 mM, β-glicerol fosfato 1 mM, pirofosfato sódico 1,25 mM y ácido Okadaico 1 μM.
- Tampón de lisis para fosfoenriquecimiento con TiO<sub>2</sub>: HEPES 20 mM pH 8, Urea 8 M, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, NaF 1 mM, β-glicerol fosfato 1 mM.
- Tampón de muestra para SDS-PAGE (4x): Tris-HCl 0,25 M pH 6,8, SDS 8 %, glicerol 20 %, azul de bromofenol 0,01 %, β-mercaptoetanol 8 %.
- Tampón UTATH: Urea 7 M, Tiourea 2 M, ASB-14 1 %, HED 50 mM pH ≥ 8.
- Tampón de electrodos para SDS-PAGE (10x): Tris 0,25 M, glicina 1 M, SDS 1 % pH 8,5.
- Solución de lavado para Western (PT): Tween 20 0,1 % en PBS.
- Solución de bloqueo para Western: 5 % de leche desnatada en polvo en PT.
- Tampón de *stripping* para Western: Tris-HCl 60 mM pH 6,7, SDS 2 %, β-mercaptoetanol 100 mM.

#### 3.1.2. Enzimas y kits.

Block-iT™ Dicer RNAi Kit (Invitrogen), Endonucleasas de restricción (Boehringer), Megascript™ High Yield Transcription Kit (Ambion), N-Glycosidase F (Roche), Phosphoprotein Purification Kit (Quiagen), Readymix™ REDTaq™ PCR Reaction Mix (Sigma), Sensimix DNA Kit (que incluye la polimerasa Taq Gold y el colorante SYBER Green) (Quantace), SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen).

#### 3.1.3. Materiales biológicos.

- Plásmidos: El plásmido original que contiene el cDNA del canal hERG fue cedido por el Dr. E. Wanke (Universidad de Milan, Italia). El cDNA de Gα<sub>t</sub> (Dr J.S. Gutkind, NIDCR, NIH, Bethesda) fue clonado como un fragmento EcoRI/XhoI en el pcDNA3 (Invitrogen). El cDNA de la fosducina

### 3. Materiales y métodos.

bovina fue clonado como un fragmento Hind III en el pcDNA3.1/Hygro (Invitrogen). El segmento carboxilo terminal de la quinasa del receptor  $\beta$ -adrenergico ( $\beta$ -ARK/CT o  $\beta$ -ARK1 (438-389) carboxyl-terminal minigen (Koch WJ, (1994)) clonado en el plásmido pREP4 (Invitrogen) fue un regalo del Dr. F. Mayor (CBM, CSIC, Madrid). El TRHR/YFP fue preparado en nuestro laboratorio clonando el cDNA del receptor de TRH como un fragmento Hind III - Bam HI en el pEYFP-N1 (Clontech). p-FLAG-CMV2-Aktwt (cedido por el Dr. Piero Crespo; Univ. de Cantabria); pEGFP-C1 (Clontech); pEYFP-N1 (Clontech).

- Microorganismos: células competentes *Escherichia coli* cepa XL1 Blue.

- Células eucariotas: líneas celulares HEK293 (*human embryonic kidney*), cepa T2 que expresan de forma estable el receptor de TRH, y cepa H36/T1 que expresan de forma estable el receptor de TRH y el canal hERG, obtenidas por la Dra. Teresa Giráldez (Giráldez T. 2001, Tesis doctoral). Línea celular GH<sub>3</sub> de adenohipófisis de rata, ATCC Cat N<sup>o</sup> CCL-82.1.

#### 3.1.4. Anticuerpos.

anti-Akt total (Cell Signaling, #9272), anti-Akt1/2 (Santa Cruz, sc-8312), anti phospho-Akt (Ser 473) (Cell Signaling, #9271), anti phospho-Akt (Thr 308) (Cell Signaling #9275), anti p44/42 MAPK (Erk1/2) Antibody (Cell Signaling #9102), anti-Phospho p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) Antibody (Cell Signaling #9101), anti hERG (C-20) (Santa Cruz, sc-15968), anti hERG (H-175) (Santa Cruz, sc-20130), anti hERG1 (CT) pan (ENZO Life Sciences ALX-215-049), anti Phospho-Threonine Antibody (Cell Signaling #9381), anti Phospho-Serine Antibody (p3430 Sigma-Aldrich), anti-GAPDH (Santa Cruz, sc-32233), Monoclonal anti- $\beta$ -Actin (Sigma-Aldrich A5441), anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (Cell Signaling #7074), anti-mouse IgG (Whole Molecule) peroxidase conjugate (Sigma-Aldrich A9044), anti-goat IgG peroxidase conjugate (Sigma-Aldrich A8919).

#### 3.1.5. Inhibidores.

E-4031 (Alomone Labs), U0126 (Cell Signaling #9903), PD98059 (Calbiochem 513000), PD184352 (Sigma-Aldrich PZ0181).

#### 3.1.6. Varios.

BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit (Pierce); BenchMark prestained protein ladder (Invitrogen); Bio Lyte 3-10 buffer Anpholyte (Bio-Rad); Calcium calibration buffer Kit #2, (Molecular Probes); Fura-2 y Fura 2/AM (Molecular Probes); Immobiline Dry strip pH 3-11 NL 7cm (GE Healthcare); Lipofectamina 2000 (Invitrogen); marcadores de tamaño de DNA (Roche); membranas de PVDF

(Bio-Rad); Nistatina (Sigma-Aldrich); Oasis HLD extraction cartridges (Waters); oligonucleótidos sintéticos (Proligo); Pro-Q Diamond Phosphoprotein Gel Stain (Invitrogen); Protein desalting Spin Columns (Pierce); Protein G Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare); Quiaprep plasmid miniprep kit (Qiagen); Random Primers p(dN)<sub>6</sub> (Roche); Spin columns Pepclean c18 (Fisher Scientific); SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce); SYPRO Ruby Protein Gel Stain (Invitrogen); Titansphere TiO<sub>2</sub> beads (Capital HPLC LTD); TRH (Sigma-Aldrich); Trizol Reagent (Invitrogen);.

Todos los productos utilizados fueron de un grado de calidad igual o superior al requerido en cada experimento.

### **3.2. Métodos.**

#### **3.2.1. Técnicas básicas en Biología Molecular.**

Las técnicas generales no mencionadas en ese capítulo se realizaron esencialmente de acuerdo con los métodos estándar descritos en Sambrook y Russell 1989.

#### **3.2.2. Cultivo y transfección de las líneas celulares.**

Las células GH<sub>3</sub> se cultivaron en placas o cubreobjetos tratados con polilisina utilizando medio DMEM F12 (Sigma-Aldrich) suplementado con 2,5 % de suero bovino fetal, 15 % de suero de caballo y 0,5 % de estreptomina/penicilina (10.000 unidades/ml). El crecimiento de las células HEK-T2 y HEK-H36/T1 tuvo lugar en medio DMEM F12 (Sigma-Aldrich) suplementado con un 10 % de suero bovino fetal y 0,5 % de estreptomina/penicilina (10.000 unidades/ml). El día antes de cada transfección se pasaron las células con una densidad cerca de la confluencia a placas de 35 mm, de forma que estuvieran en el momento de la transfección (al día siguiente) a una confluencia aproximada del 80 % o algo menos en caso de las células GH<sub>3</sub>. En el caso de que las células fueran a ser usadas posteriormente para medidas electrofisiológicas, se colocaron en cada placa 4 cubreobjetos tratados con polilisina para su uso posterior en el microscopio con las células adheridas a su superficie.

El día de la transfección se aspiró el medio y se añadió a cada placa 1 ml de medio de cultivo estándar pero sin antibióticos. Para cada transfección se prepararon 300 µl de medio DMEM F12 suplementado con L-glutamina y al que se añadieron 3 µl de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) y las cantidades de siRNAs y/o plásmido correspondientes a cada ensayo. La mezcla se añadió a las placas según las instrucciones del fabricante. Si las células iban a ser usadas para

### 3. Materiales y métodos.

medidas electrofisiológicas o para ser seleccionadas mediante el FAQstar, se incluyó además 1  $\mu$ g de pEGFP-C1 para la utilización ulterior de la eGFP expresada como marcador de transfección. Tanto las medidas de expresión de las proteínas por análisis Western y PCR cuantitativa, cómo las mediciones electrofisiológicas, se realizaron 48 h después de la transfección, a no ser que se indique otro periodo.

#### 3.2.3. Medidas electrofisiológicas.

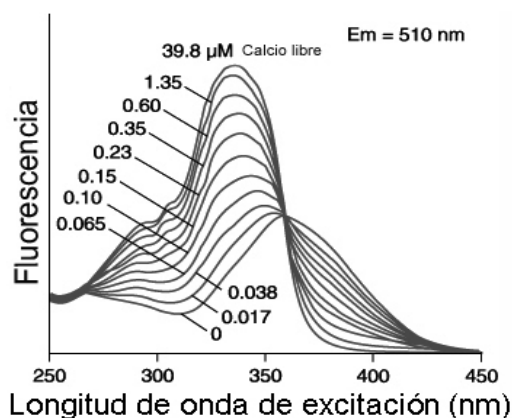
Las medidas electrofisiológicas se llevaron a cabo exclusivamente en células expresando el control positivo de transfección, es decir, la proteína fluorescente eGFP codificada por el plásmido pEGFP-C1, que se detectan mediante un microscopio de fluorescencia. En todos los casos se utilizó la variante de parche perforado de la técnica *patch clamp* (Barros F. *et al.* 1992). Esta variante es capaz de preservar en su totalidad la respuesta fisiológica a la TRH, ya que se evita el lavado de componentes celulares que se produce en la modalidad de “clamp de célula entera”.

Los electrodos utilizados (de 3 - 5 M $\Omega$  una vez rellenos con la solución de la pipeta) fueron fabricados mediante un estirador L/M-3-P-A (List Electronics Corp) a partir de capilares de borosilicato (Boralex) o vidrio Kimax. La punta del electrodo se cargó por capilaridad con una solución que contenía (en mM): KCl 65, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 30, NaCl 10, MgCl<sub>2</sub> 1, sacarosa 50 y Hepes 10, ajustada a pH 7,4 con KOH. A continuación se rellenó la parte posterior con la misma solución conteniendo además 0,3 mg/ml de nistatina, la cual fue añadida en el momento a partir de un stock de nistatina 50 mg/ml en DMSO preparado minutos antes. Esta suspensión fue sonicada vigorosamente para su introducción en la pipeta. El curso de la perforación se siguió mediante la evolución de las corrientes capacitivas de la célula, aplicando pulsos breves de +/- 10 mV a la pipeta y leyendo la resistencia en serie en los mandos del circuito de compensación de capacidad del amplificador durante el proceso. Los registros se comenzaron una vez alcanzada una resistencia de acceso menor de 50 M $\Omega$  (en general 5 - 15 min tras comenzar la perforación) y se llevaron a cabo a temperatura ambiente (20 – 25 °C) utilizando como medio extracelular medio salino estándar conteniendo (en mM) NaCl 140, KCl 1, MgCl<sub>2</sub> 1, CaCl<sub>2</sub> 2, glucosa 10 y Hepes 10, ajustando a pH 7,4 con NaOH. Para la medida de las corrientes rERG de las células GH<sub>3</sub>, antes de empezar el registro se cambió el medio extracelular por otro con alto K<sup>+</sup> y prácticamente carente de Ca<sup>2+</sup> conteniendo (en mM) KCl 140, EGTA 10, MgCl<sub>2</sub> 4, Hepes 10, ajustando a pH 7,4 con NaOH.

La estimulación y recogida de datos se realizaron con un amplificador List EPC-7 (List Electronics Corp) y el programa Pulse (Heka Electronics) gestionado por un ordenador Apple Macintosh. Los componentes óhmicos y capacitivos de las corrientes hERG en las células HEK-H36/T1 fueron sustraídos mediante el uso de un sistema P/n. Las corrientes de las células GH<sub>3</sub> se muestran sin corregir dichos componentes.

### 3.2.4. Detección de las variaciones de Ca<sup>2+</sup> citoplasmático mediante el colorante fluorescente Fura-2.

Para medir la concentración de Ca<sup>2+</sup> libre en el citoplasma usamos Fura-2, un colorante cuyo espectro de excitación varía con la concentración de Ca<sup>2+</sup>. Para calcular ésta usamos dos longitudes de onda de excitación: 340 nm, una longitud de onda en la que aumenta la emisión de fluorescencia al aumentar la concentración de Ca<sup>2+</sup>, y 380 nm, en la cual disminuye la emisión de fluorescencia al aumentar la concentración de Ca<sup>2+</sup> (Figura 7). Para que el valor de la fluorescencia sea independiente de la cantidad de colorante, del tamaño celular, del fotoblanqueo del colorante o del posible escape de este de la célula a lo largo del experimento, se utilizó el cociente entre la fluorescencia emitida al excitar a 340 y 380 nm. La carga del colorante se realizó colocando las células transfectadas en medio conteniendo 5 μM de Fura-2 durante 30 – 60 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Durante este tiempo, la forma aceto-metil éster del Fura-2 permeable a través de la membrana, es capaz de entrar en la célula, donde es hidrolizada por esterasas del citosol liberando Fura-2 cuya impermeabilidad evita su salida al exterior. Tras este tiempo las células se pasan a un medio libre de colorante durante otros 30 min para permitir completarse la hidrólisis del precursor antes de comenzar las medidas de fluorescencia.



**Figura 7. Espectros de excitación del Fura-2.** Se representa la intensidad de fluorescencia emitida a 510 nm (ordenadas) frente a la longitud de onda de excitación (abscisas). Cada trazo corresponde a una concentración de Ca<sup>2+</sup> (en μM).



### 3. Materiales y métodos.

Los registros de fluorescencia se realizaron en un microscopio invertido Zeiss Axiovert 100 equipado con un objetivo Zeiss Plan Neofluor 40x y acoplado a un monocromador Polychrome IV y una cámara CCD de 12 bits Imago (TILL-Photonics, Grafelfing, Alemania). El control del monocromador y la cámara, así como la recogida y análisis de datos se realizó con el programa TillVision (TILL-Photonics) gestionado por un ordenador PC Dell. La fuente luminosa del sistema está constituida por una lámpara de arco de Xenon de 150 W. El protocolo para el registro de fluorescencia consistió en ciclos repetidos de 500 ms de duración en los cuales se irradiaron las células a 340, 380 y 360 nm durante 10/20 ms a cada longitud de onda. Esta última longitud de onda a la que la fluorescencia del Fura-2 es independiente de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  se utilizó para comprobar que los niveles del colorante permanecían estables a lo largo del experimento. Para traducir a concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático los datos de la relación de fluorescencias obtenidos a 340/380 nm se compararon los valores de fluorescencia con una curva patrón obtenida previamente utilizando un conjunto de tampones de concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  conocida (Calcium calibration buffer Kit #2) y colocando en una gota de cada uno de ellos una cantidad fija de Fura-2 para comprobar el nivel de fluorescencia. Las medidas de los niveles del catión fueron obtenidas en cada célula individual del campo del microscopio tras delimitar el perímetro de las mismas digitalmente mediante el software de análisis.

#### 3.2.5. Análisis estadístico.

Los datos se presentan como media  $\pm$  S.E.M. (error estándar de la media) indicando con “n” el número de células estudiadas en cada caso. Las posibles diferencias entre ellos se estimaron mediante el test paramétrico “T de Student” (con datos desapareados y dos colas). En ocasiones, debido a la dispersión de los datos las varianzas no eran homogéneas de acuerdo con el test de “Barlett”, obteniéndose diferencias significativas en las desviaciones estándar. En esos casos se utilizó el test “Welch” que asume poblaciones gaussianas con desviaciones estándar no homogéneas. En todos los casos se consideraron estadísticamente significativas las diferencias cuando el p valor era  $< 0,05$ .

#### 3.2.6. Extracción del RNA.

La extracción del RNA de las células en cultivo se realizó usando el reactivo Trizol Reagent 48 h después de plaquearlas, y en el caso de células transfectadas, a las 48 h de la transfección. El procedimiento consistió en aspirar el medio de cultivo, adicionando posteriormente 1 ml del reactivo Trizol a cada placa de 35 mm y pasando la mezcla por la punta

de la pipeta varias veces para asegurar la lisis celular. A este lisado se le añadió 200 µl de cloroformo, y la mezcla se agitó vigorosamente en un Vortex durante 20 seg, y se centrifugó a 12000 x g durante 5 min a 4 °C. Tras esta centrifugación se separan dos fases, quedando en la fase superior acuosa el RNA, que en un paso posterior se precipitó con 500 µl de isopropanol. Finalmente se centrifugó a 12000 x g durante 5 min, obteniéndose un precipitado que después de ser lavado con etanol al 70 % se dejó secar para resuspenderlo en un volumen adecuado de tampón TE. Para calcular la concentración del RNA se midió su absorbancia a 260 nm, ya que una unidad de  $A_{260}$  de ssRNA es igual a 40 µg/ml. La relación  $A_{260}/A_{280}$ , que indica la pureza del RNA, fue siempre de un valor entre 1,9 y 2,1.

### 3.2.7. Diseño y preparación de siRNAs.

#### 3.2.7.1. Obtención de una mezcla de siRNAs contra Akt humano.

El material genético de partida para la síntesis de la mezcla de siRNAs contra hAkt fue obtenido por PCR a partir del plásmido p-FLAG-CMV2-AKTwt, que contiene el cDNA para la isoforma Akt1 humana (hAkt1) (Figura 8). Para ello se transformaron células competentes con el plásmido, se crecieron en LB-ampicilina y se purificó el plásmido mediante el *Plasmid midi/maxi Kit* (Qiagen). Para asegurar su identidad se realizó un estudio de restricción.

Dado que la secuencia del cDNA de hAkt1 tiene una longitud excesiva para las indicaciones técnicas de uso de este tipo de mezclas, se dividió en dos regiones: una 5' de 955 pb y otra 3' de 817pb, que cubren la mayor parte de la secuencia codificante de hAkt1. Usando el plásmido como molde se realizaron dos PCRs para amplificar esas dos regiones con objeto de obtener a partir de ellas dos mezclas de siRNAs: 5' ó amino y 3' ó carboxilo. Cada una de las dos mezclas de reacción de PCR contenía: 300 nM de los cebadores correspondientes (ver secuencias en

Tabla I), 50 ng del plásmido molde, 36,5 µl de *Red Taq PCR reaction mix* y agua hasta los 75 µl de volumen final. Los cebadores se caracterizan por llevar en su mitad 5' la secuencia del promotor para la RNA polimerasa del fago T7, de modo que cada uno de los productos de las amplificaciones estará flanqueado por secuencias promotoras invertidas una respecto a la otra. La amplificación se realizó en un termociclador marca Eppendorf de acuerdo con el siguiente esquema:

95 °C 4 min    95 °C 30 s    52 °C 1 min    72 °C 1 min    72 °C 5 min  
30 ciclos

### 3. Materiales y métodos.

El resultado de las amplificaciones se analizó en un gel de agarosa. Los productos amplificados se purificaron mediante extracción fenol-cloroformo y posterior precipitación con acetato sódico y etanol.

```
1  CGGCAGGACC GAGCGCGGCAGGC GGCTGGCCAGCGCAGCCAGCGCGGCCCGAAGGACGGGAGCAGGCGG
   CCCGAGCACC GAGCGCTGGGCACC GGGCACC GAGCGGCGGCACGCGAGGCCCGGCCCGGAGCAGCGCC
   CCGGCCCGCCGCGGCC TCCAGCCCGGCCCGGCCAGCGC GGGCCCGGGGATGCGGAGCGCGGGCGCC
   GGAGGCCGCGGCCGGCTAGGCCCGCGCTCGCGCCCGGACGCGGCGGCCCGGGGCTTAGGGAAGGC GAG
   CCAGCCTGGGTCAAAGAAGTCAAAGGGGCTGCCTGGAGGAGGCAGCCTGTCAGCTGGTGCATCAGAGGCT
351  GTGGCCAGGCCAGCTGGGCTCGGGGAGCGCCAGCCTGAGAGGAGCGCGTGAGCGTCCGCGGAGCCCTGGG
   CACCATGAGCGACGTGGCTATTGTGAAGGAGGGTTGGCTGCACAAACGAGGGGAGTACATCAAGACCTGG
   CGGCCACGCTACTTCCCTCAAGAATGATGGCACCTTTCATTGGCTACAGGAGCGGCCGCAAGGATGTGG
   ACCAACGTGAGGCTCCCTCAACAACCTTCTGTGGCGCAGTGCCAGCTGATGAAGACGGAGCGGCCCG
   GCCCAACACCTTCATCATCCGCTGCCTGCAGTGGACCAC TGCATCGAACGCACCTTCCATGTGGA GACT
701  CCTGAGGAGCGGGAGGAGTGGACAACC GCCATC CAGACTGTGGCTGACGGCCTCAAGAAGCAGGAGGAGG
   AGGAGATGGACTTCCGGTCCGGGTCACCCAGTGACAAC TCAAGGAGTGAAGAGATGGAGGTGTCCC TGGC
   CAAGCCAAGCACC GCGTGACCATGAACGAGTTT GAGTACCTGAAGCTGCTGGGCAAGGGCAC TTTCCGGC
   AAGGTGATCCTGGTGAAGGAGAAGGCCACAGGCCGCTAC TACGCCATGAAGATCCTCAAGAAGGAA GTCA
1051  TCGTGGCCAAGGACGAGGTGGCCACACACTCACC GAGAACC GCGTCC TCGAGAAC TCCAGGCACC CTT
   CCTCACAGCCCTGAAGTACTCTTTCCAGACCACGACC GCTCTGCTTTGTCATGGAGTACGCCAACGGG
   GCGGAGCTGTTCTTCCACCTGTCCCGGAGCGTGTGTTTCCGAGGACC GGGCCCGCTTCTATGGC GCTG
   AGATTGTGTCAGCCCTGGACTACCTGCACTCGGAGAAGA ACGTGGTGTACC GGGACC TCAAGCTGGAGAA
   CCTCATGCTGGACAAGGACGGGCACATTAAGATCACAGACTTCGGGCTGTGAAGGAGGGGATCAA GGAC
   GGTG CACCATGAAGACCTTTTGGCGCACACCTGAGTACTGGCCCCGAGGTGTGGAGGACAATGACT
1401  ACGGCCGTGCAGTGGACTGGTGGGGGCTGGGCGTG GTCATGTACGAGATGATGTGCGGTC GCCTGCCCTT
   CTACAACCAGGACCATGAGAAGCTTTT GAGCTCATCCTCATGGAGGAGATCCGCTTCCCGCGCAC GCTT
   GGTCCCGAGGCCAAGTCTTGTCTTTCAGGGGCTGCTCAAG AAGGACCCCAAGCAGAGGCTTGGCGGGGGCT
   CCGAGGACGCCAAGGAGATCATGACGATCGCTTCTTTGCCGGTATCGTGTGGCAGCACGTGTACGAGAA
   GAAGCTCAGCCACCCTTCAAGCCCAAGGTCACGTCGGA GACTGACACCAGGTATTTTGTAGAGGATTC
1751  ACGGCCAGATGATCACCATCACACCCTGAC CAAGATGACAGCATGGAGTGTGTGGAC AGCGAGCGCA
   GGCCCCACTTCCCCAGTTCTCTACTCGGCCAGCGGCACGGCCTGAGGCGGCGGTGGACTGCGCTGGAC
   GATAGCTTGGAGGGATGGAGAGGCGGCC TCGTGCCATGATCTGTATTTAATGGTTTTTATTTCTCGGGTG
   CATTGAGAGAAGCCACGCTGTCTCTCGAGCCAGATG GAAAAGACGTTTTTGTGCTGTGGGCAGCACCC
   TCCCCCGCAGCGGGGTAGGGAAGAAA ACTATCCTGCGGG TTTAATTTATTTTCAT CACAGTTGTTC TCCG
2101  GGTG TGGCCTCAGCCCTCAGAACAATCCGATTCACGTAGGGAAATGTTAAGGACTTCTGCAGCTATGCGC
   AATGTGGCATTGGGGGCGCGGCGAGGTCTTGCCTATGT TCCCTCACCTGTCAGCCAGCCGCCC TGGG
   CTGTCTGTCAACAGCTATCTGTCTCTCTCGGGGCCCTGGGCTCAGTTCAACCTGGTGGCACCAGATG
   CAACCTCACTATGGTATGCTGGCCAGCACCCCTCTCTG GGGGTGGCAGGCACACAGCAGCCCCCAGCAC
   TAAGGCCGTGTCCTGAGGACGTCATCGGAGGCTGGGCC CTTGGGATGGGACCAGGGATGGGGGATGGGC
2451  CAGGGTTTACCAGTGGGACAGAGGAGCAAGGT TTAATTTGTTATTGTATTATGTTGTTCAAATGCA
   TTTTGGGGGTTTTAATCTTTGTGACAGGAAAAGCCC TCCCTTCCCCCTTCTGTGTCACAGTCTTGGTG
   ACTGTCCACCAGGGAGCCTCCCCCTCAGATGATCTCTCCACGGTAGCAC TTAGCCTTTTCGACGCTTAAC
   CTTTCGCTGTCGCCCCAGGCCCTCCCTGAC TCCCTGTGGGGTGGCCATCCCTGGGCCCTCCAC GCCT
   CCTGGCCAGACGCTGCCGCTGCCGCTGCACCAGGCGTT TTTTACAACATTCAAC TTTAGTATTTTAC
2801  TATTATAATATAATATGGAACCTTCCCTCCAAA TCTTCAATAAAAAGTTGCTTTTCAAAAAA
   AAAAAA
```

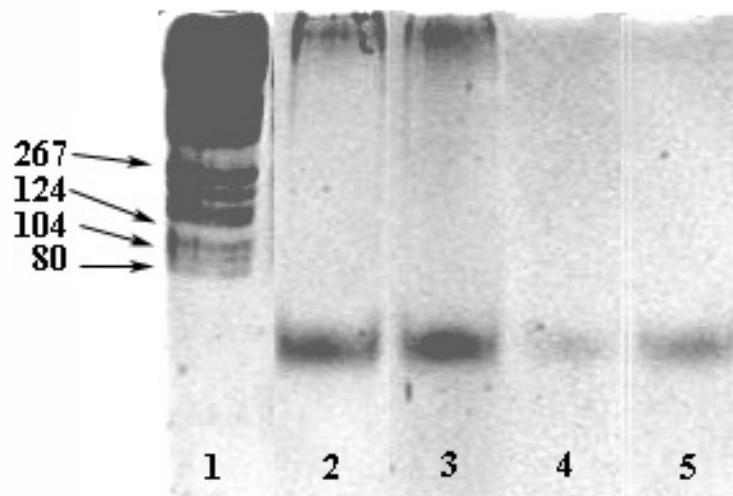
**Figura 8. Secuencia del cDNA de Akt humano (GenBank NM\_001014432.1).** Se señalan en rojo las secuencias de los cebadores hAkt1 3’/C T.I.V. y en azul las de los cebadores hAkt1 5’/N T.I.V.

Una vez obtenidos los fragmentos amplificados de DNA se procedió a su transcripción *in vitro* (T.I.V.). Para ello utilizamos *Megascript<sup>TM</sup> high yield Transcription kit* (que incluye la RNA polimerasa viral de T7) con 1 µg del DNA molde (amplificado por PCR) correspondiente en un volumen final de 20 µl, siguiendo las indicaciones del fabricante y dejando incubar la reacción durante toda la noche a 37 °C. Como los fragmentos de DNA molde tienen el promotor de T7 a ambos lados, cada transcripción da lugar a dos cadenas de RNA complementarias, que se asocian en la propia mezcla de reacción dando dsRNA. A continuación, las mezclas de reacción se trataron durante 15 min a 37 °C con DNasa I libre de RNasa y luego el dsRNA se purificó mediante una extracción fenol-cloroformo seguida de otra extracción con cloroformo y

finalmente una precipitación con isopropanol, tras lo cual las muestras se resuspendieron en 100 µl de TE. Para calcular el rendimiento del proceso se midió la absorbancia a 260 nm y se aplicó la siguiente relación:  $A_{260nm} \times \text{factor de dilución} \times 45 \mu\text{g/ml} = \mu\text{g/ml dsRNA}$ .

Cebadores	Secuencia 5'→3'
hAkt1 5' / N T.I.V.	Dir. : CGCTAATACGACTCACTATAGGGCTGCACAAACGAGGGGAGTA
	Rev. : CGCTAATACGACTCACTATAGGGTGCCGCAAAGGTCTTCATG
hAkt1 3' / C T.I.V.	Dir. : CGCTAATACGACTCACTATAGGGCCACCATGAAGACCTTTTGC
	Rev. : CGCTAATACGACTCACTATAGGGACACCCGGAGAACAAACTGG
rAkt1 RT	GAGAAACAAAACCATCAGGTACAG
rAkt1 T.I.V.	Dir. : CGCTAATACGACTCACTATAGGGTGGCTGATGGACTCAAACGG
	Rev. : CGCTAATACGACTCACTATAGGGTCCACACTCCATGCTGTC

**Tabla I. Secuencias de los cebadores para las amplificaciones de hAkt1 y rAkt1.** Se indica en gris la zona de secuencia correspondiente al promotor de T7, en azul y rojo las secuencias específicas para T.I.V. de hAkt1 para la zona 5' y 3', en amarillo la secuencia del cebador para RT de rAkt1, en verde claro las secuencias específicas para T.I.V. de rAkt1.



**Figura 9. Análisis de los productos de la reacción de Dicer sobre el dsRNA de hAkt1.** 1) marcadores de tamaño Marker V (Roche); 2) 4 µl de la mezcla de siRNAs amino antes de purificar; 3) 4 µl de la mezcla de siRNAs carboxilo antes de purificar; 4) 1 µl de la mezcla de siRNAs amino después de la purificación; 5) 1 µl de la mezcla de siRNAs amino después de la purificación.

Finalmente, para la obtención de los siRNAs se trataron 60 µg de cada uno de los dsRNA con el enzima Dicer usando *Block-It Dicer enzyme kit*, a fin de obtener los fragmentos de 21 pb. Las dos mezclas de siRNAs se purificaron finalmente con *Block-it RNAi purification kit*, en ambos casos siguiendo las indicaciones del protocolo del fabricante. Para evaluar el correcto funcionamiento de estos procesos en la obtención de siRNAs, se midió su absorbancia a 260 nm y se comprobó su estado en un gel de poliacrilamida al 20 % en TBE (Figura 9).

### 3. Materiales y métodos.

#### 3.2.7.2. Obtención de mezclas de siRNAs contra Akt1 de rata.

Para la obtención del cDNA de rAkt1 mediante transcripción reversa se tomaron 5 µg de RNA total de células GH<sub>3</sub> y 2 pmoles del cebador rAkt1 RT complementario al mRNA y diseñado a partir de la secuencia del cDNA de rAkt1 (Figura 10), completando con agua hasta 12 µl. Esta mezcla se calentó en un baño a 70 °C durante 10 min, tras lo cual se pasó a hielo. Después se utilizó el kit de retrotranscripción *Superscript<sup>TM</sup> II RNase H Reverse Transcriptase* añadiendo a la disolución anterior sus componentes: 4 µl de (5x) *First strand buffer*, 2 µl de DTT 0,1 M y 1 µl de dNTPmix 10 mM. Esta mezcla se incubó en un baño a 42 °C durante 2 min, tras los cuales se añadió 1 µl del enzima *Superscript II* (200 U) y se volvió a incubar durante 50 min a 42 °C. Después de este tiempo se paró la reacción calentando a 70 °C durante 15 min. Finalmente, para hidrolizar completamente el RNA se usaron 2 U de RNasa H, incubando durante 20 min a 37 °C.

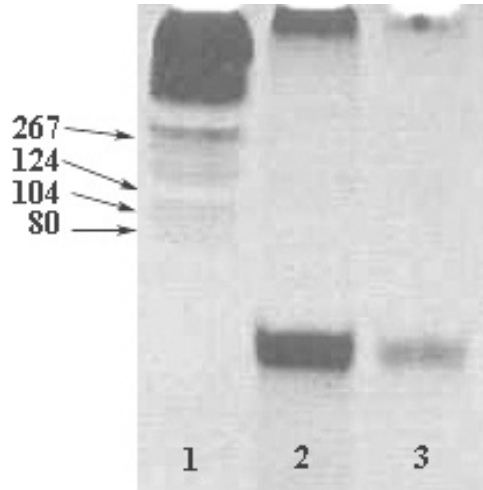
```
1 GAATTCCTGGGTTACCCGGTGTGTGGGGGCCACGGATACCATGAACGACGTAGCCATTGTGAAGGAGG
GCTGGCTGCACAAACGAGGGGAATATATTTAAACCTGGCGGCCACGCTACTTCCTCCTCAAGAATGATGG
CACCTTTATTGGCTACAAGGAACGGCCTCAGGATGTGGAGCAGCGAGTCCCCACTCAACAACCTTCTCA
GTGGCACAATGTGAGCTGATGAAGACAGAGCGGGCCGAGGCCAACACCTTCATCATCCGCTGCCTGCAGT
GGACCACGGTCATTGAGCGCACCTTCCATGTGGAACGCCTGAGGAGCGGGAAAGAGTGGACCACCGCCAT
351 TCAGACTGTGGCTGATGGACTCAAACGGCAGGAGGAGGAGACGATGGACTTCCGGTCAGTTCAACCCAGT
GACAACTCAGGTGCTGAGGAGATGGAGTGGCCCTGGCCAAGCCCAAGCACCGTGTGACCATGAACGAGT
TTGAGTACCTGAAGCTACTGGGCAAGGGCACTTTGGGAAGGTGATCCTGGTGAAGGAGAAGGCCACAGG
TCGCTACTATGCCATGAAGATCCTCAAGAAGGAGGTGATCGTTGCCAAGGATGAGGTTGCCACACGCTT
ACTGAGAACCGTGTCTGCAGAACTTAGGCATCCCTTCTTACAGCCCTCAAGTACTCATTCCAGACCC
701 ACGACCGCCTCTGCTTTGT CATGGAGTACGCCAATGGAGGGCAGCTCTTCTTCCACCTGTCTCGTGAGCG
CGTGTTTTCAGAGGACCGGGCCCGCTTCTACGGT GCGGAGATTGTGTCCGCCCTGGACTACTTGCCTCC
GAGAAGAACGTGGTGTACCGGGACCTCAAGCTGGAGAACCTCATGCTGGACAAGGACGGGCACATCAAGA
TAACGGACTTCGGGCTGTGCAAGGAGGGTATCAAGGACGGTGCCACCATGAAGACGTTCTGCGGGACACC
CGAGTACCTGGCCCTGAGGTGCTGGAGGACAACGACTATGGCCGTGCAAGTGGACTGGTGGGGGCTGGGC
1051 GTGGT CATGTACGAGATGATGTGCGGGCCGCTGCCCTTCTACAACCAGGACCATGAGAAGCTGTTGAGC
TCATCCTAATGGAGGAGATCGCTTCCCACGCACACTCGGGCCGAGGCCAAGTCCCTGCTCTCGGGGCT
GCTCAAGAAGGACCTACACAGAGGCTCGGTGGGGGCTCCGAGGACGCCAAGGAGATCATGCAAGCACC
TTCTTTGCCAATCGTGTGGCAAGATGTGTATGAGAAGAAGCTGAGCCACCTTTCAAGCCCAGGTCA
CCTCTGAGACCGACACCAGGTATTTTGTGAGGAGTTCAAGCTCAGATGATCACCATCACACCGCCTGA
1401 TCAAGATGACAGCATGGAGTGTGTGGACAGTGAACGGAGGCCGCACTTTCCCAGTTCTCCTACTCAGCC
AGTGGCACAGCCTGAGGCCTGGGGTGGTGGCTGGCAGCCCTGCACCCCTCTGCATTGCCGAGTCCAGAAG
CCCCGATGGATCATCTGTACCTGATGGTTTTGTTTCTCGGATGTGCTGGGGAGAACCTCGCCAGCCTC
GGAATTC
```

Figura 10. Secuencia del cDNA de Akt de rata (GenBank NM\_033230.1). Se resaltan en amarillo la secuencia complementaria al cebador rAkt1 RT y en verde las de los cebadores rAkt1 T.I.V.

Para sintetizar la segunda hebra se hizo una PCR en la que se utilizó en cada reacción una décima parte de la reacción de síntesis de cDNA (2 µl), poniendo también 6 pmoles de cada cebador rAkt1 T.I.V. La reacción se completó con 25 µl del enzima *RedTaq<sup>TM</sup> PCR Reaction Mix*, y agua hasta completar los 50 µl del volumen final. La amplificación se realizó en un termociclador marca Eppendorf imponiendo las siguientes condiciones:

95 °C 4 min    95 °C 30 s    50 °C 1 min    72 °C 1 min    72 °C 5 min  
35 ciclos

Una vez amplificada a dsDNA la zona deseada del cDNA de rAkt1, continuamos con la síntesis de siRNAs mediante una transcripción *in vitro* y un posterior tratamiento con el enzima Dicer, siguiendo el mismo proceso que para hAkt1. El análisis de los siRNAs obtenidos en un gel de poliacrilamida/TBE al 20 % se muestra en la Figura 11.



**Figura 11. Análisis de los productos de la reacción de Dicer sobre los dsRNAs de rAkt1.** 1) Marcadores de tamaño Marker V; 2) 4  $\mu$ l de la mezcla de siRNAs rAkt1 sin purificar; 3) 1  $\mu$ l de la mezcla de siRNAs contra rAkt1 purificada.

### 3.2.7.3. Obtención de mezclas de siRNAs contra PASK humana y de rata.

Para la síntesis de las mezclas de siRNAs dirigidos contra PASK humana y de rata se siguió el mismo proceso descrito anteriormente para los siRNAs de rAkt1. En este caso los cebadores utilizados fueron los siguientes:

Cebadores	Secuencia 5'→3'
hPask T.I.V.	Dir. : CGCTAATACGACTCACTATAGGGCAAGGAGGTGGTGGTGAAGTTTAT
	Rev. : CGCTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAAACACCTCTTCCCATGTAT
hPask RT	GTTTAGCTGGTCAGCAGACGG
rPask T.I.V.	Dir. : CGCTAATACGACTCACTATAGGGTTGCTTTCATTGACCGTCATCC
	Rev. : CGCTAATACGACTCACTATAGGGCCCAAACCATGTGGAGAAGAGG
rPask RT	CTCCTTCTCCAGTGGGAAGCC

**Tabla II. Secuencias de los cebadores para las amplificaciones de hPask y rPask.** Se indica en gris la zona de secuencia correspondiente al promotor de T7.

### 3. Materiales y métodos.

#### 3.2.7.4. Diseño de siRNAs específicos contra Akt1 humano y de rata.

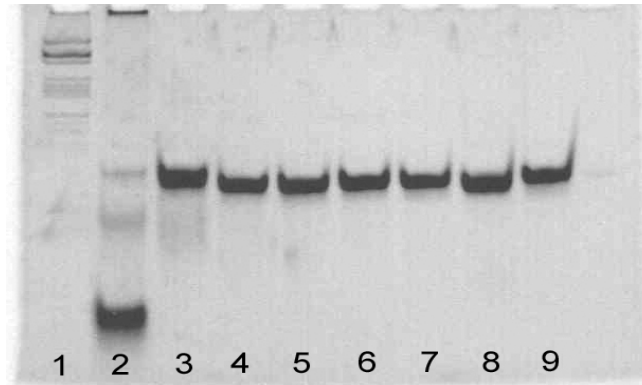
Además de las mezclas de siRNAs originadas mediante la digestión de un fragmento largo de dsRNA por el enzima Dicer, también se utilizaron siRNAs dirigidos específicamente contra secuencias de 21 pb dentro de los mRNAs para Akt1 de rata y de hombre, diseñando en cada caso tres siRNAs específicos. Para este diseño, se partió en primer lugar de la secuencia completa del cDNA de Akt correspondiente, humano o de rata (Figura 8 y Figura 10), y, usando las herramientas informáticas que ofrecen diferentes casas comerciales, se realizaron varias búsquedas de secuencias candidatas. Estas herramientas informáticas utilizan algoritmos de selección de siRNAs como los de Reynolds, Amarzguioui y Prydz, o Huesken (Reynolds *et al.* 2004; Amarzguioui y Pryz 2004; Huesken *et al.* 2005; Amarzguioui *et al.* 2006) y valoran cada siRNA candidato según cumpla más o menos requisitos de los tomados en cuenta para elaborar cada algoritmo. Por otra parte, las secuencias seleccionadas se analizaron mediante el programa BLAST para asegurar que no son complementarias a otros mRNA y evitar así efectos inespecíficos. De todas las candidatas, al final se eleccionaron las secuencias indicadas en la Tabla III, por ser las de mayor puntuación usando varios algoritmos de selección. En todo caso, es importante tener en cuenta que éstos son una mera herramienta aproximativa que recoge las características principales que comparten los siRNAs con una eficacia demostrada, pero que su uso no asegura unos buenos niveles de silenciamiento.

Organismo	Nombre	Secuencia 5'→3'
Rattus Norvegicus	467	AGCACCGUGUGACCAUGAATT
	1112	UGUUCGAGCUCAUCCUAAUTT
	1388	UCACACCGCCUGAUCAAGATT
Homo sapiens	501	ACUUCCUCCUCAAGAAUGATT
	858	UGACCAUGAACGAGUUUGATT
	2127	CCGAUUCACGUAGGGAAAUTT

**Tabla III. Secuencia de los siRNAs diseñados contra rAkt y hAkt.** Las secuencias que se muestran son las correspondientes a la hebra con sentido. Nótese que en el extremo 3' de cada secuencia se añaden dos nucleótidos de timina que serán los que queden desapareados al hibridarse con su hebra complementaria (Amarzguioui y Pryz 2004).

Una vez elegidas las secuencias de los siRNAs, éstos se encargaron a la compañía Thermo-Fisher, que los suministró liofilizados, por lo que fue necesario redissolverlos según las indicaciones del fabricante, obteniendo al final soluciones 20 mM de cada siRNA. Para verificar

el tamaño, integridad y pureza de estos siRNAs, se analizaron en un gel de poliacrilamida/TBE al 20 % (Figura 12).



**Figura 12. Análisis de los siRNAs diseñados contra rAkt1 y hAkt1.** 1) Marcadores de DNA Marker V; 2) marcadores de DNA de 12, 24 y 36 pares de bases. 3) 2 µl de la mezcla de siRNAs contra hAkt de la zona 3'. 4) 5) y 6) 2 µl de los siRNAs 467, 1112 y 1388 contra rAkt1. 7) 8) y 9) 2 µl de los siRNAs 501, 858 y 2127 contra hAkt1.

### 3.2.7.5. Uso de siRNAs específicos contra ERK1 y ERK2.

Para el silenciamiento de la expresión génica de las quinasas ERK 1 y ERK2 tanto en células de rata como humanas utilizamos preparaciones de siRNAs específicos comercializadas por la casa comercial Dharmacon, que consisten en mezclas de cuatro siRNAs específicos para cada gen. En la

Tabla IV se indican las secuencias:

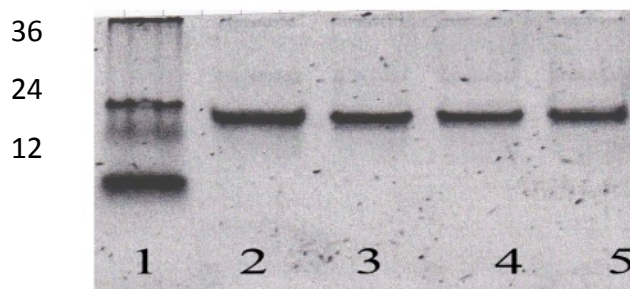
Gen	Nombre producto	Secuencias 5'→3'
ERK2 (MAPK 1) rata	M-096054-00-0010	UCACAAGAGGAUUGAAGUU
		UCGAGUUGCUAUCAAGAAA
		AAAAUAAGGUGCCGUGGA
		ACACUAAUCUCUCGUACAU
ERK1 (MAPK 3) rata	M-100592-00-0010	CAGAGUGGCUAUCAAGAAG
		AAGAGGACCUAAAUUGUUAU
		CAACCACAUUCUAGGUUAU
		GACCGGAUGUUAACCUUUA
ERK2 (MAPK 1) humano	M-003555-04-0010	CCAAAGCUCUGGACUUAUU
		AAACAGAUUUUACAAGCU
		CAAGAGGAUUGAAGUAGAA
		GUACAGGGCUCCAGAAUU
ERK1 (MAPK 3) humano	M-003592-03-0010	GACCGGAUGUUAACCUUUA
		AGACUGACCGUACAAGUU
		GCUACACGCAGUUGCAGUA
		CCGGCUUCCUGACGGAGUA



### 3. Materiales y métodos.

**Tabla IV. Secuencias de los siRNAs de Dharmacon contra rERK1/2 y hERK1/2.** Las secuencias que se muestran son las correspondientes a la hebra codificante.

Estos siRNAs fueron suministrados liofilizados, por lo que fue necesario redissolverlos según las indicaciones del fabricante, obteniendo al final soluciones stock 1  $\mu$ M para cada siRNA. Para verificar el tamaño, integridad y pureza, fueron analizados en un gel de poliacrilamida/TBE al 20 % (Figura 13).



**Figura 13. Análisis de los siRNAs específicos contra ERK1 y ERK2 de rata y humano.** 1) marcadores de tamaño de DNA de 12, 24 y 36 pares de bases; 2) 3) 4) y 5) 100 ng de siRNA contra rERK2, rERK1, hERK2 y hERK1.

#### 3.2.8. Obtención de extractos celulares y análisis western.

Para analizar mediante western blot la expresión de proteínas específicas en muestras celulares, se recogieron las células, se lavaron con PBS, se precipitaron por centrifugación a 6000 rpm durante 1 min y los precipitados se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  para la obtención posterior de los extractos celulares. Para la lisis de estas muestras celulares, se resuspendieron en 100  $\mu$ l de tampón RIPA mediante agitación vigorosa y se sonicaron 4 veces durante 2 min, separando cada sonicación por una incubación de 30 segundos en hielo. A continuación se centrifugaron 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$  y se recogieron los sobrenadantes, que son los extractos celulares. Para la cuantificación de la concentración proteica de los extractos se usó el *BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit* siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para su carga en geles de SDS-PAGE, se añadió a las muestras tampón de carga en la proporción adecuada, se calentaron a  $95^{\circ}\text{C}$  durante al menos 5 min y se cargaron directamente. En algunos experimentos se cargaron 100  $\mu$ g de proteína por calle, y las proteínas se separaron en un minigel de SDS-PAGE al 10 %, mientras que en otros experimentos se cargaron 200  $\mu$ g de proteína en maxigeles de SDS-PAGE al 8 % para buscar una mayor resolución. Una vez separadas las proteínas, se procedió a una electrotransferencia a membranas de PVDF a 100 V durante 1 h con refrigeración. La inmunodetección se realizó mediante procesos convencionales, usando solución PT con leche desnatada en polvo al 5 %

tanto para bloquear como para incubar los anticuerpos. En el caso de los anticuerpos fosfoespecíficos, el bloqueo y la incubación con los anticuerpos primarios se realizó sustituyendo la leche en polvo por BSA al 5 %. Los anticuerpos primarios se incubaron durante toda la noche a 4 °C, usando una dilución 1:250 - 1:500 para los de Santa Cruz y 1:1000 - 1:2000 para los de Cell Signaling. Los anticuerpos secundarios se utilizaron en una dilución 1:5000 en ambos casos. La detección por quimioluminiscencia de los anticuerpos secundarios se llevó a cabo usando el sistema *SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate*.

### **3.2.9. Electroforesis bidimensional.**

Para la realización de análisis mediante electroforesis bidimensional (2D-PAGE), las muestras celulares se recogieron de forma similar a la descrita en el apartado anterior, pero en este caso se usó UTATH como tampón de lisis. Este tampón es incompatible con los ensayos de medida de proteína. Así, para asegurarnos de cargar la misma cantidad de proteína en cada muestra se realizó un gel de carga con distintas cantidades de cada una para luego igualar las concentraciones de los extractos. Las muestras se pasaron a continuación por columnas de desalado (*Protein desalting Spin Columns*) previamente equilibradas con tampón UTATH suplementado con 0,5 % de tampón de anfolitos. Para la primera dimensión se realizó un isoelectroenfoque en un gradiente de pH 4-11 no lineal, usando en cada caso 125 µl de muestra para cada tira de 7 cm. El isoelectroenfoque se realizó en un aparato Ettan IPGphor II (Amersham) en las siguientes condiciones: 12 h a 30 V, 250 Vh a 500 V, 500 Vh a 1000 V y 8000 Vh a 5000 V (Vh = voltios-hora, siendo estos la integral de los voltios aplicados a lo largo del tiempo). Una vez finalizado el isoelectroenfoque las tiras se lavaron y se equilibraron en un tampón con urea 6 M, glicerol 30 % (v/v), Tris 50 mM pH 6,8, SDS 2 %, y azul de bromofenol 0,002 % (p/v), durante media hora con agitación dos veces. La separación de las proteínas en la segunda dimensión se realizó mediante un gel de SDS-PAGE al 10 % suplementado con HED 50 mM y urea 6 M. Los geles obtenidos fueron teñidos utilizando azul de Coomassie R250 y/o los colorantes fluorescentes SYPRO Ruby y el fosfoespecífico Pro-Q, siguiendo en cada caso las instrucciones del fabricante.

### **3.2.10. PCR cuantitativa.**

En algunas muestras se midieron niveles de un mRNA específico (de la quinasa PAS) usando un sistema *Abi Prism 7000 Sequence Detection System* (Applied Biosystems). Para ello, 5 µg de RNA total obtenido de células tratadas o no con siRNAs se retrotranscribieron a cDNA

### 3. Materiales y métodos.

usando como cebadores 250 ng de *Random Primers* p(dN)<sub>6</sub>, añadiendo primero a la mezcla 1 µl de dNTPmix 10 mM y agua hasta 12 µl. Esta mezcla se incubó en un baño a 65 °C durante 5 min y se centrifugó brevemente, tras lo cual se le añadieron 4 µl de (5x) *First Strand Buffer* y 2 µl de DTT 0,1 M, mezclando bien e incubando a 25 °C durante 2 min. Finalmente se añadió 1 µl de Superscript II RT para comenzar la reacción, que se incubó a 25 °C durante 10 min y a 42 °C durante 50 min. Luego se inactivó el enzima a 70 °C durante 15 min, se añadió 1 µl (1,5 U) de RNAsa H y se incubó a 37 °C durante 20 min para degradar el RNA.

Para realizar la PCR cuantitativa a partir del cDNA molde total usamos en cada caso los cebadores específicos para la secuencia del cDNA de PAS quinasa humana o de rata (además de los del control de β-actina) que se muestran en la

Tabla V, seleccionados gracias al programa Primer Express (Applied Biosystems):

Cebadores	Secuencia 5' → 3'
hPask Directo	TCTTCGCTTTCATCGACCG
hPask Inverso	CAGCTTGATTGTGAAGTCCTCG
rPask Directo	GGTGGAACATGCCAACATAATC
rPask Inverso	GGATGACGGTCAATGAAAGCA
β-Actina Directo	CATTGCTGACAGAGGATGCAGAAG
β-Actina Inverso	GCTCAGGAGGAGCAATGATCTT

**Tabla V. Secuencias de los oligonucleótidos cebadores para la PCR cuantitativa.** Se indican los cebadores directo e inverso usados en las PCRs cuantitativas. Los cebadores correspondientes a β-Actina tienen una secuencia común para hombre y rata.

Para poder trabajar con el cDNA total en este caso, se hizo una dilución 1:5 ó 1:10, según lo concentrado que estuviese inicialmente, para así añadir una cantidad en un rango entre 200-400 ng a cada reacción de PCR cuantitativa y evitar que la amplificación suceda en un ciclo muy temprano. Respecto a las mezclas de la PCR cuantitativa, cada pocillo contenía los siguientes componentes: 7,5 µl de la solución SensiMix (que posee la polimerasa Taq Gold, dNTPs, tampón y el colorante ROX), 0,3 µl del colorante fluorescente SYBR Green, 2 µl de la dilución de cDNA y 5 pmoles de los cebadores directo e inverso, completándose hasta 15 µl con agua. Como control de la cantidad de cDNA que hay en cada muestra, se amplificó también el cDNA de la proteína β-actina usando cebadores específicos (donados por el Dr. Pedro Zuazua). Todas las muestras se realizaron por triplicado. Al mismo tiempo se prepararon controles tanto con cebadores del gen a estudiar como de β-actina pero sin cDNA, para comprobar que no

existía amplificación sin molde. Finalmente se realizó la PCR cuantitativa, cuyo protocolo de amplificación es:

95 °C 10 min      95 °C 15 s      60 °C 1 min  
40 ciclos

La cuantificación de los niveles de mRNA de cada gen se hizo en función de los valores de ciclo umbral de amplificación de ese gen y usando  $\beta$ -actina como control en cada muestra, mediante el programa Abi Prism 7000 (Applied Biosystems).

### **3.2.11. Enriquecimiento de fosfoproteínas mediante columnas de purificación.**

La purificación de proteínas fosforiladas se realizó utilizando el *Phosphoprotein Purification Kit* de Qiagen. Partimos de dos placas de 10 cm de diámetro de células GH<sub>3</sub> o HEK-H36/T1 para cada condición a estudiar. Las células se recogieron cuando estaban a un 70-80 % de confluencia, para lo que se retiró el medio de cultivo de las placas y se añadieron 5 ml de tampón de lisis (incluido en el kit), ayudándonos de un rascador para obtener un mayor número de células. Se dejaron 30 min en hielo para que el tampón de lisis actuara para romperlas por completo, y tras esto se centrifugaron 30 min a 10.000 x g y 4 °C de temperatura y nos quedamos con el sobrenadante, eliminando así los restos celulares insolubles. Se midió la concentración de proteína total presente en este extracto celular mediante el método BCA, y se usaron 2,5 mg de proteína para cada purificación de fosfoproteínas. Las columnas de purificación se basan en una cromatografía de afinidad gracias a la cual las proteínas fosforiladas son retenidas por la columna y las proteínas no fosforiladas eluyen. Las columnas se cargaron con los 2,5 mg de extracto celular en un volumen de 25 ml y se dejaron eluir. Tras el paso de la muestra a través de la columna se hizo un lavado con 4,5 ml de tampón de lisis, y luego se recuperaron las fosfoproteínas que se habían unido utilizando el tampón de elución incluido en el kit, haciendo cinco eluciones de 500  $\mu$ l para obtener un volumen total de muestra de 2,5 ml de extracto celular enriquecido en proteínas fosforiladas. Finalmente se concentró el extracto utilizando columnas de ultrafiltración YM10 Microcon (Millipore) para reducir su volumen hasta unos 100  $\mu$ l, obteniendo así concentraciones finales que oscilan entre 0,5 y 1  $\mu$ g/ $\mu$ l.

### **3.2.12. Inmunoprecipitación de *erg*.**

Antes de recoger las células se realizaron dos lavados con PBS frío al que se han añadido NaF 1 mM y Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM. A continuación las células se recogieron y se lisan añadiendo

### 3. Materiales y métodos.

tampón de lisis de inmunoprecipitación y con la ayuda de un rascador, y se guardan en tubos *ependorf*. Se dejaron durante 30 min en hielo para que se complete la lisis de los extractos celulares, y se cuantificó en ellos la cantidad de proteína mediante un análisis BCA. Los extractos se incubaron con 10  $\mu$ l de Proteína G Sepharosa (GE) durante una hora a 4 °C con rotación. Se centrifugó 1 min a 13.000 rpm, el sobrenadante se recogió y se pasó a un nuevo tubo en el que se añadió el anticuerpo anti-hERG (C-20) en una proporción de 2  $\mu$ g de anticuerpo por cada mg de proteína de extracto, y se incubó con el anticuerpo toda la noche a 4 °C en una noria. A continuación se añadieron 20  $\mu$ l de Proteína G Sepharosa y se incubaron otras 2 h más a 4 °C con rotación. El sobrenadante se eliminó por centrifugación a 13.000 rpm durante 5 min y el precipitado resultante se lavó 5 veces con 500  $\mu$ l de tampón de lisis para inmunoprecipitación. Finalmente se resuspendió la proteína G Sepharosa unida al anticuerpo en tampón de muestra para SDS-PAGE (4x).

#### 3.2.13. Espectrometría de masas MALDI-ToF.

Las manchas procedentes de geles de electroforesis bidimensional a analizar por espectrometría de masas se recortaron del gel y se trocearon en fragmentos de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup>. Se destiñeron incubando dos veces 30 min en bicarbonato amónico 25 mM/acetoneitrilo (70/30 v/v) suplementado con HED 50 mM, y a continuación se secaron los trozos de gel a 90 °C durante 15 min. Una vez secos se les añadió tripsina (12 ng/ $\mu$ l en bicarbonato amónico 25 mM) y se dejó digiriendo durante una hora a 60 °C. Tras la digestión se acidificaron las muestras añadiendo un volumen adecuado de TFA 1 % para dejar el pH  $\leq$  2. Luego las muestras fueron sonicadas durante 10 min y finalmente se realizó la purificación de los péptidos resultantes mediante cromatografía de fase reversa con una resina de C-18, utilizando para ello puntas Zip-Tips. Para ello se humedece el C-18 con acetoneitrilo y se equilibra con TFA 0,1 %. A continuación, los péptidos se fijan a la resina y se lavan 10 veces con TFA 0,1 %. Finalmente se eluyen con 3  $\mu$ l de matriz (CHCA 10 mg/ml, TFA 0,1 %, acetoneitrilo 50 %) sobre una placa de 96x2 pocillos (Applied Biosystems).

Las muestras se analizaron en un espectrómetro de masas MALDI-Tof (Voyager-DE STR, Applied Biosystems). Los datos de 200 disparos de láser se utilizaron para generar un espectro de masas para determinar las huellas peptídicas de las muestras mediante el programa Data Explorer (Applied Biosystems). Las masas así obtenidas se compararon con las teóricas recogidas en la base de datos Swiss-Prot con el motor de búsqueda MASCOT (Matrix Science), realizando una búsqueda PMF (*Peptide Mass Fingerprint*) (<http://www.matrixscience.com>). En

las condiciones de estas búsquedas se permitió un error de corte de tripsina, no se aplicaron restricciones de masa o punto isoeléctrico, la tolerancia de masa peptídica se fijó a  $\pm 1,2$  Da y se añadió como modificación variable la oxidación de metionina (Millares *et al.* 2012). Los resultados de la búsqueda obtenidos se muestran con un *score* que representa  $-10 \log P$ , donde P es la probabilidad (valor absoluto) de que la coincidencia observada sea fruto del azar, por lo que mayores *scores* indican una probabilidad menor. También se indica si este *score* corresponde a un valor estadísticamente significativo (cuando la probabilidad de que sea fruto del azar es  $< 0,05$  %) y el *expectation value* que indica el número de coincidencias que pueden ocurrir por azar a ese determinado *score*.

#### **3.2.14. Tratamiento con N-glicosidasa.**

Para el tratamiento con N-glicosidasa utilizamos la PNGase F (N-Glycosidase F, Roche), y extractos celulares de células GH<sub>3</sub> o HEK-H36/T1 crecidas en una placa de 10 cm de diámetro. Cuando las células alcanzaron un 70 - 80 % de confluencia, se recogieron en 600  $\mu$ l de tampón de lisis celular y se dejaron 30 min en hielo para permitir la lisis completa de las células. Para evitar que el tampón de lisis interfiriera con la actividad de la N-Glicosidasa F, se pasaron los extractos a columnas de microfiltración Microcon YM10 y se centrifugó durante una hora a  $14.000 \times g$  y  $4$  °C, se lavó con 150  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O para quitar los restos de tampón, y se repitió la centrifugación. Una vez eliminado el tampón de lisis se dio la vuelta a la columna y se recogieron las proteínas en 100  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O. A éstas se añadió tampón de desnaturalización de glicoproteínas (incluido con el enzima) para una concentración final de 1x, y las muestras se calentaron 10 min a  $100$  °C. Tras esta desnaturalización se añadió el tampón de reacción (incluido con el enzima), detergente NP-40 para el 1 %, 2  $\mu$ l del enzima PNGase F (N-Glicosidasa F), y se incubó a  $37$  °C durante 18 h. Una vez finalizada la incubación se almacenó la muestra a  $-70$  °C hasta su posterior uso.

#### **3.2.15. Fosfoproteómica cuantitativa.**

El análisis de los cambios en fosforilación de proteínas en respuesta a TRH se llevó a cabo en colaboración con los Dres. Pedro Cutillas y Pedro Casado del Barts Cancer Institute, Barts and The London School of Medicine, perteneciente a la Queen Mary University de Londres. Para ello se utilizaron las técnicas de fosfoproteómica cuantitativa *label-free* puestas a punto en su grupo de investigación (Casado y Cutillas 2011; Montoya *et al.* 2011; Beltrán y

### 3. Materiales y métodos.

Cutillas 2012), mediante las cuales se analizaron tanto extractos celulares enriquecidos en fosfopéptidos como bandas proteicas procedentes de SDS-PAGE.

#### 3.2.15.1. Fosfoenriquecimiento con $\text{TiO}_2$ .

La preparación de muestras de extractos celulares enriquecidos en fosfoproteínas se realizó por triplicado para cada línea celular, con el fin de obtener buenos datos estadísticos. Las células HEK-H36/T1 y GH<sub>3</sub>, control y tratadas con TRH 1  $\mu\text{M}$ , se crecieron por triplicado en placas de 10 cm de diámetro y se recogieron usando el tampón de lisis para fosfoenriquecimiento. Los extractos celulares resultantes se sonicaron 3 veces durante 15 s, usando un sonicador de sonda y pasando las muestras a hielo 15 s entre cada sonicación. A continuación, los extractos se centrifugaron a 20.000 x g durante 5 min a 4 °C y se recogió el sobrenadante, del cual se utilizaron 500  $\mu\text{g}$  para la digestión con tripsina y su posterior análisis por espectrometría de masas. Para la digestión se incubaron con DTT 4,1 mM y iodoacetamida 8,3 mM durante 15 min, luego se diluyeron hasta una concentración de urea 2 M añadiendo HEPES 20 nM pH 8 y se incubaron durante 16 h a 37 °C con tripsina-TPCK inmovilizada en bolas de agarosa. La digestión con tripsina se paró añadiendo TFA 1 %, y la solución peptídica resultante se desaló mediante una extracción en fase sólida usando columnas *Oasis HLD extraction cartridges* (Waters). Para ello estas columnas se activaron con 1 ml de acetonitrilo y luego se equilibraron con 1,5 ml de solución de lavado (acetonitrilo 2 %, TFA 0,1 % en agua), tras lo cual se cargaron con las muestras procedentes de la digestión previa, dejando eluir por gravedad. Una vez que las muestras habían pasado por las columnas, éstas se lavaron con 1 ml de la solución de lavado, y a continuación se realizó la elución de los péptidos añadiendo 0,5 ml de una solución de ácido glicólico 1 M en acetonitrilo 80 % y TFA 5 % (GAT). Las muestras ya desaladas se ajustaron a un volumen de 750  $\mu\text{l}$  con GAT, y a continuación se incubaron 5 min con 25  $\mu\text{l}$  de  $\text{TiO}_2$ , tras lo que se añadieron a columnas C-18 de fase reversa (Pepclean), tras lo cual se empaquetaron mediante una centrifugación a 1000 rpm durante 30 s. A continuación las columnas se lavaron consecutivamente con 300  $\mu\text{l}$  de GAT, 300  $\mu\text{l}$  de acetonitrilo 50 % y finalmente con 300  $\mu\text{l}$  de acetato amónico 20 mM pH 6,8 en acetonitrilo 50 %. Seguidamente se realizó la elución de los fosfopéptidos, para lo que se añadieron a las columnas 50  $\mu\text{l}$  de  $\text{NH}_4\text{OH}$  5 % dejando incubar 1 min, y a continuación se centrifugaron a 1000 rpm durante 30 s. Esta elución se repitió otras dos veces más para al final combinar las tres fracciones y obtener un volumen total de 150  $\mu\text{l}$ . Luego, las muestras se acidificaron mediante la adición de un 10 % del volumen de ácido fórmico (aproximadamente 15  $\mu\text{l}$ ), y se dejaron secar durante 18 h usando un

SpeedVac. Los precipitados resultantes completamente secos se guardaron a -20 °C hasta su posterior análisis.

### **3.2.15.2. Digestión de bandas proteicas para su análisis mediante LC-MS/MS.**

Las bandas teñidas con azul de Coomassie que fueron seleccionadas para su análisis mediante espectrometría de masas se procesaron para obtener los péptidos y realizar el análisis posterior de éstos. Para ello se recortó cada banda de gel en fragmentos pequeños (de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup>), que se lavaron tres veces con metanol al 50 % y una vez más con metanol al 100 %, con lo que se consiguió desteñir y deshidratar los fragmentos de gel. Luego se secaron en un SpeedVac el tiempo necesario para su completa deshidratación (unos 20-30 min). Para la preparación de la muestra, en primer lugar se redujeron los puentes disulfuro tratando los fragmentos de gel con DTT 10 mM en una solución de bicarbonato amónico 25 mM pH 8 y dejando incubar durante 45 min a 50 °C con agitación. A continuación se retiró el DTT y se añadió iodoacetamida 50 mM en una solución de 25 mM de bicarbonato amónico pH 8, dejando incubar una hora a temperatura ambiente en oscuridad para que se produjera la alquilación de las cisteínas. Tras la incubación se lavó un par de veces con metanol al 50 %, y nuevamente se dejó secar en el SpeedVac hasta su completa deshidratación (40-50 min). A continuación se procedió con la digestión triptica, para lo que se les añadió a los fragmentos de gel tripsina (al menos 50 ng, y hasta 200 ng para fragmentos grandes de gel) en bicarbonato amónico 25 mM pH 8, y se dejó durante 5 min hasta la completa absorción de la tripsina, tras lo cual los fragmentos se cubrieron con más bicarbonato amónico (para cubrirlos completamente), dejándolos incubar a 25 °C con agitación hasta el día siguiente. Una vez digeridas las proteínas dentro del gel se extrajeron los péptidos. Para ello se añadieron 100 µl de una solución de metanol 50 % con ácido fórmico 1 %, se incubó 5 min, y el sobrenadante se transfirió a un tubo *Eppendorf Protein Lo-Bind*. A continuación los fragmentos de gel se lavaron con 100 mM de bicarbonato amónico usando el volumen suficiente para cubrirlos completamente y se incubaron otros 5 min, y el sobrenadante resultante se transfirió al mismo tubo utilizado en el paso anterior. Este lavado se realizó dos veces más, añadiendo cada vez los sobrenadantes al mismo tubo *Eppendorf Protein Lo-Bind*. Este tubo, ya con los péptidos extraídos del gel, se secó completamente en el SpeedVac (normalmente se requieren 18-24 h) y una vez secos los péptidos se almacenaron a -20 °C hasta su posterior análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas tándem.



### 3. Materiales y métodos.

#### 3.2.15.3. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas tándem.

Los péptidos, previamente deshidratados, se disolvieron en 20  $\mu$ l de TFA 0,1 % y se cargaron en un espectrómetro de masas *Linear Trap Quadrupole* (LTQ) Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific) acoplado a una cromatografía de ultra-alta eficacia (UPLC, nanoAcquity, Waters). La UPLC se llevó a cabo con un flujo de carga de 2  $\mu$ l/min durante 8 min, seguido de un gradiente de elución de 400 nl/min con una presión operativa de 3000 psi. La separación de los péptidos se realizó en una columna de fase reversa de 100  $\mu$ m x 100 mm (BEH130 C18, 1,7  $\mu$ m Waters), usando como fases móviles la solución A (ácido fórmico 0,1 % en agua) y la solución B (ácido fórmico 0,1 % en acetonitrilo). El gradiente de corrido fue del 1 % al 35 % de solución B durante 45 min seguido por un lavado de 5 min al 85 % de la solución B y tras esto, un paso de equilibrado de 10 min al 1 % de la solución B. Los espectros de cada fracción se obtuvieron en el Orbitrap con una resolución de 30.000 y una relación masa/carga de 400. Los cinco péptidos más abundantes de cada espectro se seleccionaron para ser fragmentados mediante disociación inducida por colisión y analizados en el LTQ-Orbitrap XL.

Los datos obtenidos en el LTQ-Orbitrap XL se analizaron usando Mascot Daemon (v2.2.2; Matrix Science), que utiliza el motor de búsqueda Mascot para comparar los espectros obtenidos con la base de datos Swiss Prot. Los resultados se consideraron significativos cuando tenían un *expectation value* menor de 0,05 en Mascot y mantenían una tasa de falsos positivos inferior al 2 %. En el caso de fosfopéptidos con múltiples sitios de fosforilación se utilizó la diferencia en puntuación de Mascot entre diferentes *hits* para identificar la posición correcta. Los datos se extrajeron de Mascot exportándolos a Excel, donde se obtuvieron los cromatogramas y se calculó la altura de los picos y sus áreas, para lo cual se utilizó el programa *Pescal (Peak Statistic Calculator)* desarrollado por el grupo del Dr. Pedro Cutillas (Cutillas y Vanhaesebroeck 2007), e incorporado a Excel como macro. Así, las intensidades de cada péptido son normalizadas respecto a la intensidad total del cromatograma. El coeficiente de variación de las medidas realizadas se calculó como el porcentaje de la diferencia entre la desviación estándar y la media. Para realizar el análisis de la variación en los niveles de fosforilación de cada fosfopéptido en función del tratamiento se utilizó un ANOVA de múltiples factores, tomando como estadísticamente significativos aquellos fosfopéptidos con un incremento o disminución de su fosforilación mayor del 50 % y con un p-valor < 0,05.

### 3.2.16. Mutagénesis dirigida mediante PCR.

Para la generación de mutantes de hERG el método utilizado fue el descrito por Ho *et al.* (1989), que permite la generación de variantes con mutaciones puntuales o pequeñas inserciones. La generación de mutantes constó de tres etapas sucesivas, que se corresponden con tres reacciones de PCR.

Para llevar a cabo este tipo de mutagénesis se requieren cuatro oligonucleótidos cebadores. Dos de estos oligonucleótidos (sentido y antisentido) contienen la mutación a introducir y han de hibridar con las dos hebras de cDNA en la posición donde se desea efectuar dicha mutación. Los otros dos (sentido y antisentido) han de hibridar en posiciones alejadas y más o menos equidistantes de la mutación. Además, estos oligonucleótidos “externos” han de hibridar en zonas cercanas a sitios de restricción de interés en el cDNA.

En la primera etapa se amplificaron dos fragmentos de DNA mediante dos reacciones de PCR independientes 5' y 3', utilizando en cada una uno de los oligonucleótidos mutados y uno de los externos. Los 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 purificaron los fragmentos 5' y 3' a partir de geles de agarosa, para evitar contaminaciones con el cDNA nativo.

La segunda etapa consistió en una reacción de PCR en ausencia de oligonucleótidos, incluyendo solamente 100-300 ng de cada fragmento 5' y 3' obtenido en la etapa anterior. Así, debido a que ambos fragmentos hibridan entre sí por la 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 varió realizándose según estos parámetros:

98 °C 5 min    98 °C 1min    52 °C 10 min    72 °C 15 min    72 °C 5 min  
10 ciclos

Al final de esta etapa se obtuvo un fragmento amplificado de dsDNA con la mutación deseada, y cuyo tamaño corresponde a la distancia entre los oligonucleótidos externos.

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

El fragmento final resultante se purificó a partir de geles de agarosa, o directamente de la mezcla de PCR, y finalmente se digirió con las endonucleasas de restricción adecuadas. Por

### 3. Materiales y métodos.

último, el fragmento así obtenido conteniendo la mutación deseada se utilizó para reemplazar el fragmento de tipo silvestre del DNA nativo.

Los mutantes puntuales de hERG obtenidos usando esta metodología fueron:

**hERG SA4:** se sustituyeron las serinas de las posiciones S239 y S243 por alaninas.

**hERG SA1:** se sustituyeron las serinas de las posiciones S261, S263 y S264 por alaninas.

**hERG SA8:** se sustituyeron las serinas de las posiciones S239, S243, S261, S263, S264, S351 y S354 y la treonina T353 por alaninas. En este caso la región mutada del SA4 se incluyó en el SA1 y sobre este canal con cinco mutaciones se mutó la región 351-354 para obtener un canal con las ocho mutaciones.

**hERG S1137A:** se sustituyó la serina S1137 por alanina.

**hERG S1137D:** se sustituyó la serina S1137 por ácido aspártico.

**hERG SA9:** se combinó la mutación S1137A con el mutante SA8, para obtener un canal con nueve sitios mutados a alanina (S239, S243, S261, S263, S264, S351, S353, S354 y S1137) .

## 4. Resultados.

#### 4. Resultados.

#### **4.1. Estudios comparativos de las acciones de la TRH en células GH<sub>3</sub> y HEK-H36/T1.**

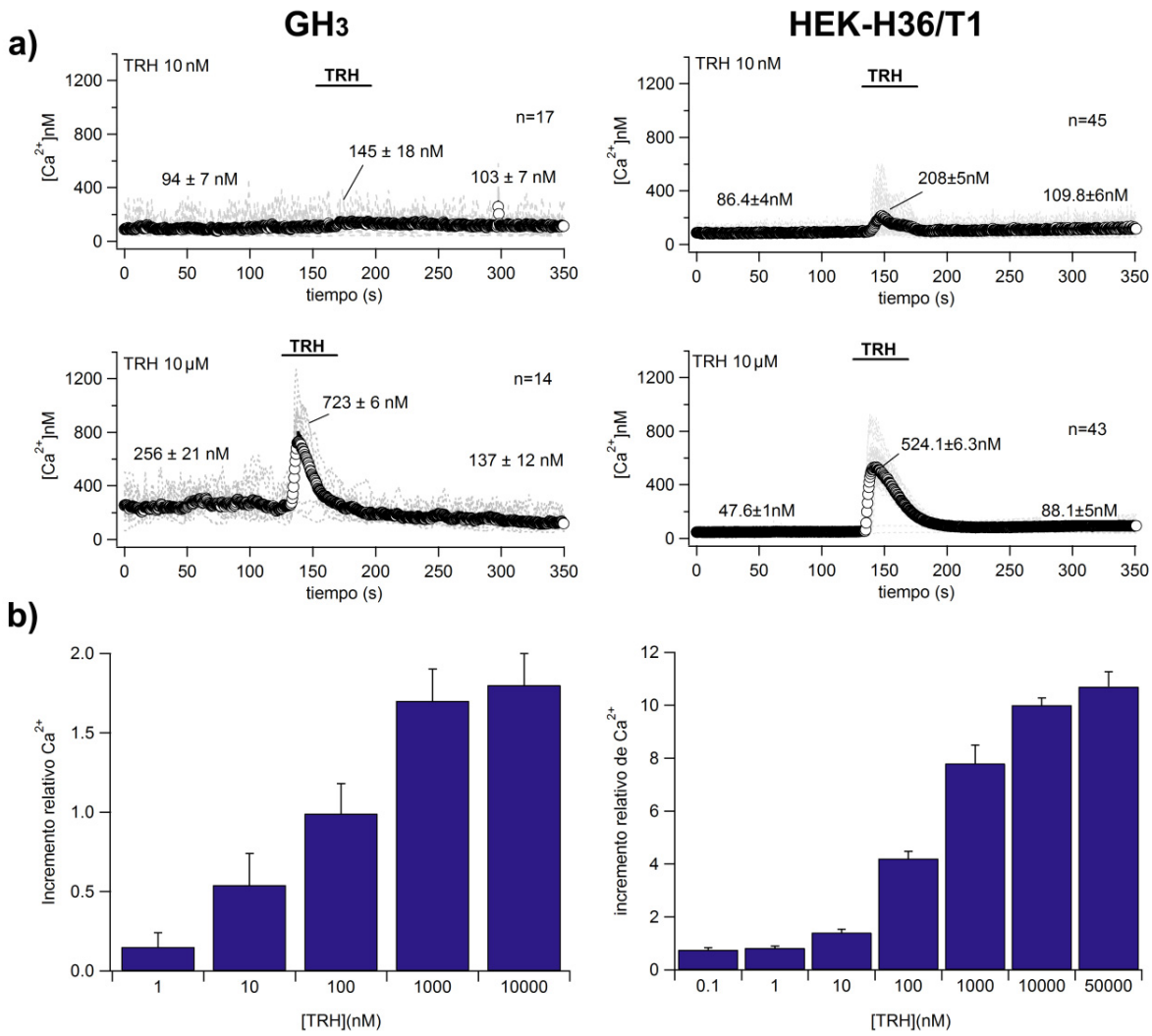
##### **4.1.1. Estudio de la dependencia de la dosis en los efectos de la TRH observados en células GH<sub>3</sub> y HEK-H36/T1.**

Para el estudio de la regulación hormonal de los canales *erg* por parte de la hormona TRH, se han utilizado dos líneas celulares diferentes, las células GH<sub>3</sub> de adenohipófisis de rata, que expresan de forma nativa el canal rERG y el receptor de TRH, y las células HEK-H36/T1 obtenidas en nuestro laboratorio (Giráldez 2001, Tesis Doctoral), que expresan de forma exógena y abundante el canal hERG y el receptor de TRH, constituyendo un sistema de expresión heterólogo de gran utilidad para las medidas del canal y su regulación por TRH. Dado que estudios previos de nuestro laboratorio apuntaban a la existencia de ciertas diferencias entre estas dos líneas celulares respecto a la inhibición de *erg* mediada por la TRH (Miranda *et al.* 2005), y con el fin de comprobar si el motivo de esas diferencias podría radicar en la composición de las cascadas de señalización que acoplan el receptor de TRH a la modulación de los canales *erg*, comenzamos realizando un estudio comparativo de dependencia de la concentración de hormona en las respuestas que produce a nivel de Ca<sup>2+</sup> y de corrientes *erg* en ambos tipos celulares.

##### **4.1.1.1. Efecto de la TRH sobre las concentraciones intracelulares de Ca<sup>2+</sup>.**

En primer lugar comparamos las características de las respuestas a nivel de aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular ante diferentes concentraciones de hormona. Para ello se realizaron medidas de Ca<sup>2+</sup> libre intracelular usando el colorante fluorescente Fura-2, tal y como se ha indicado en Métodos. De forma breve, los cubreobjetos con células cargadas de Fura-2 se colocan en el microscopio de fluorescencia y se los perfunde con medio salino extracelular, midiéndose la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular basal durante aproximadamente 1,5 min, para a continuación cambiar a un medio salino extracelular al que se le ha añadido TRH a la concentración deseada, registrándose los cambios en la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular durante el período indicado en los distintos experimentos.

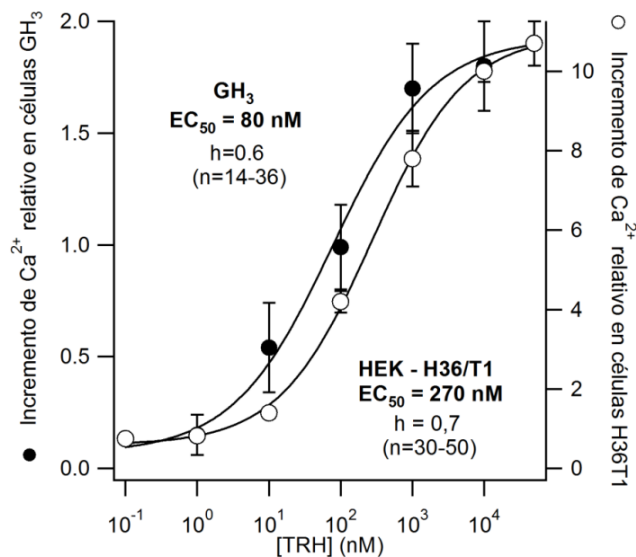
4. Resultados.



**Figura 14. Estudio de la respuesta del Ca<sup>2+</sup> intracelular ante diferentes concentraciones de TRH en células GH<sub>3</sub> y HEK-H36/T1.** a) Desarrollo temporal de un registro de Ca<sup>2+</sup>, en células GH<sub>3</sub> a la izquierda y HEK-H36/T1 a la derecha. Se muestran los resultados en células tratadas con 10 μM de TRH en la parte superior y 10 nM en la parte inferior. El periodo de perfusión con la hormona se indica mediante una línea horizontal. Los símbolos corresponden al promedio (± S.E.M.) de los valores punto a punto del total de las células individuales analizadas indicadas en cada caso (n), representadas mediante las líneas discontinuas grises. Las concentraciones promedio antes de la adición de la hormona, en el máximo inicial y a lo largo de todo el periodo subsiguiente a la caída del pico, son indicadas en las gráficas. b) Incrementos inicial de la Ca<sup>2+</sup> intracelular inducido por la TRH. Se indica el incremento de la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular alcanzado en el pico inicial de respuesta a TRH (Fase I) relativo a la concentración media de Ca<sup>2+</sup> intracelular de la célula antes de la adición de TRH.

Como se observa en la Figura 14, el incremento relativo de Ca<sup>2+</sup> intracelular en células HEK-H36/T1 es del orden de 10 - 12 veces para las concentraciones más altas de TRH, mucho mayor que el registrado en células GH<sub>3</sub> en las que el incremento es sólo de dos veces para las mayores concentraciones de la hormona. Es probable que a esto contribuya de forma importante el hecho de que en las células HEK-H36/T1 la concentración intracelular basal de Ca<sup>2+</sup> es mucho menor, ya que las células GH<sub>3</sub> generan potenciales de acción de Ca<sup>2+</sup> de forma espontánea que dan lugar a continuas oscilaciones de los niveles basales de Ca<sup>2+</sup> (Figura 14) y mantienen un nivel relativamente elevado del catión. En todo caso, al estudiar la dependencia

de la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  respecto a la concentración de TRH usada para disparar la respuesta, vemos que dicha dependencia obedece a una curva sigmoidea en ambos tipos celulares. Como se ve en el análisis de la Figura 15, la  $\text{EC}_{50}$  obtenida en las células  $\text{GH}_3$  es de 80 nM, similar a la observada en dichas células al estudiar las respuestas secretoras a la TRH (Barros *et al.* 1991). Por su parte, la  $\text{EC}_{50}$  en las células HEK-H36/T1 tiene un valor en el mismo orden de magnitud, del orden de 270 nM. Así pues, aún cuando se espere un número de receptores hormonales muy distinto en ambos tipos celulares, los efectos de la TRH sobre los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular no se producen a menores concentraciones de hormona en las células HEK-H36/T1 en las que los receptores de TRH han de ser mucho más abundantes que en  $\text{GH}_3$ .



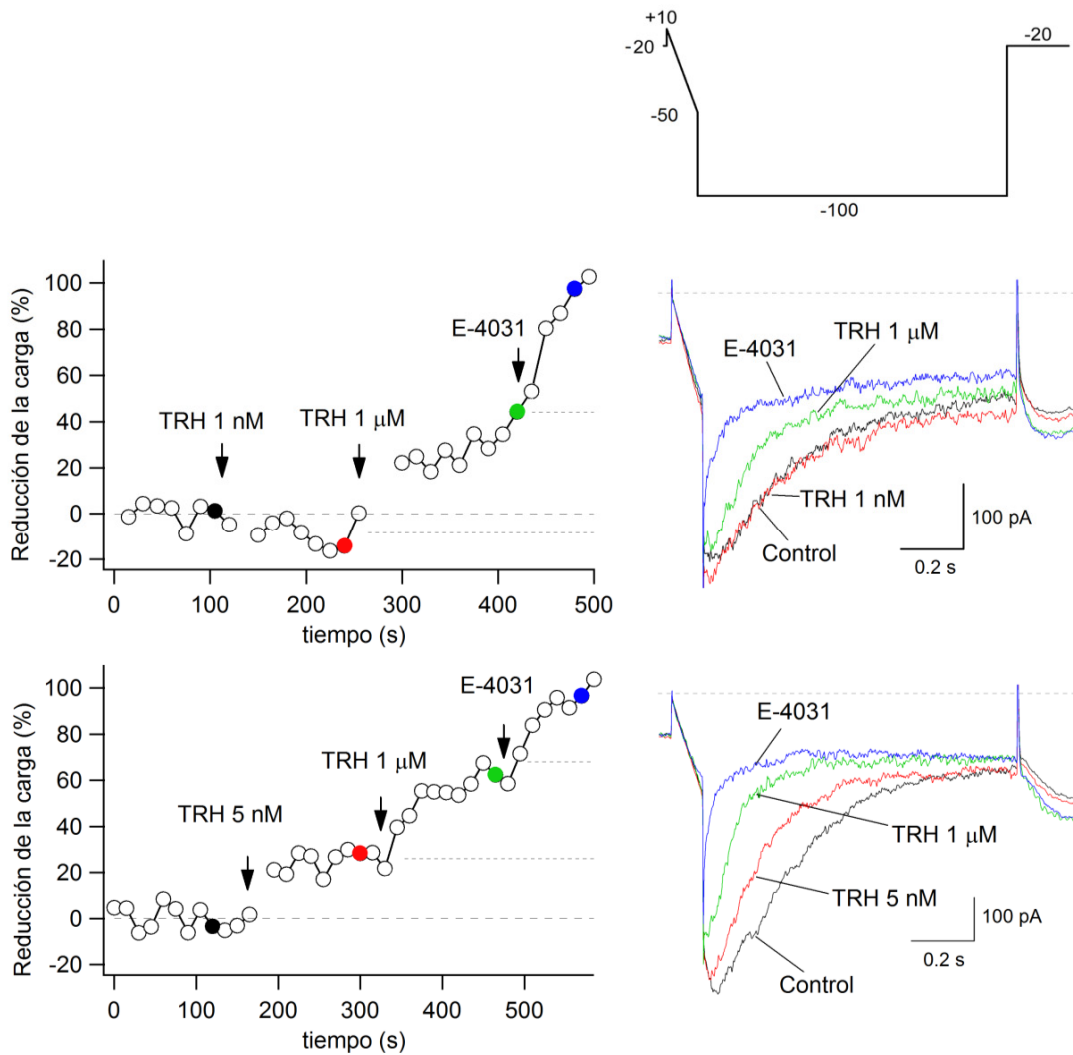
**Figura 15. Dependencia de la respuesta a nivel de los incrementos de calcio intracelular respecto a la concentración de la TRH en células  $\text{GH}_3$  y HEK-H36/T1.** Se muestran curvas dosis-respuesta del incremento relativo de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en respuesta a la TRH en células  $\text{GH}_3$  (círculos negros) y HEK-H36/T1 (círculos blancos). Las líneas continuas corresponden a los ajustes a ecuaciones de Hill:  $y = \text{base} + (\text{max} - \text{base}) / [1 + (\text{EC}_{50}/x)^h]$  que mejor se adaptan a los datos. Los valores del ajuste y el número de células ensayadas a cada concentración se muestran en la gráfica.

#### 4.1.1.2. Efecto de la TRH sobre las corrientes *erg*.

De forma similar a lo que se acaba de exponer respecto a los aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, también se estudió la regulación del canal *erg* en respuesta a diferentes concentraciones de TRH. Para estos registros se utilizó la técnica de *patch clamp* en la modalidad de parche perforado, para evitar el lavado del interior celular y poder evitar así la pérdida de componentes intracelulares que pudieran ser esenciales para el efecto hormonal.



#### 4. Resultados.



**Figura 16. Curso temporal de los efectos de la TRH sobre las corrientes rERG en células GH<sub>3</sub>.** A la izquierda se muestra el curso temporal de la variación en la cantidad de corriente rERG con el tiempo en dos células representativas. Se señalan con flechas los momentos en los que se añade TRH a la concentración indicada ó de E-4031 5  $\mu$ M. La adición de una concentración saturante de TRH 1  $\mu$ M se usa como control positivo de inhibición hormonal. A la derecha se muestran los registros de corrientes correspondientes a los momentos marcados con puntos coloreados en los paneles de la izquierda y obtenidos con el protocolo mostrado en la parte superior.

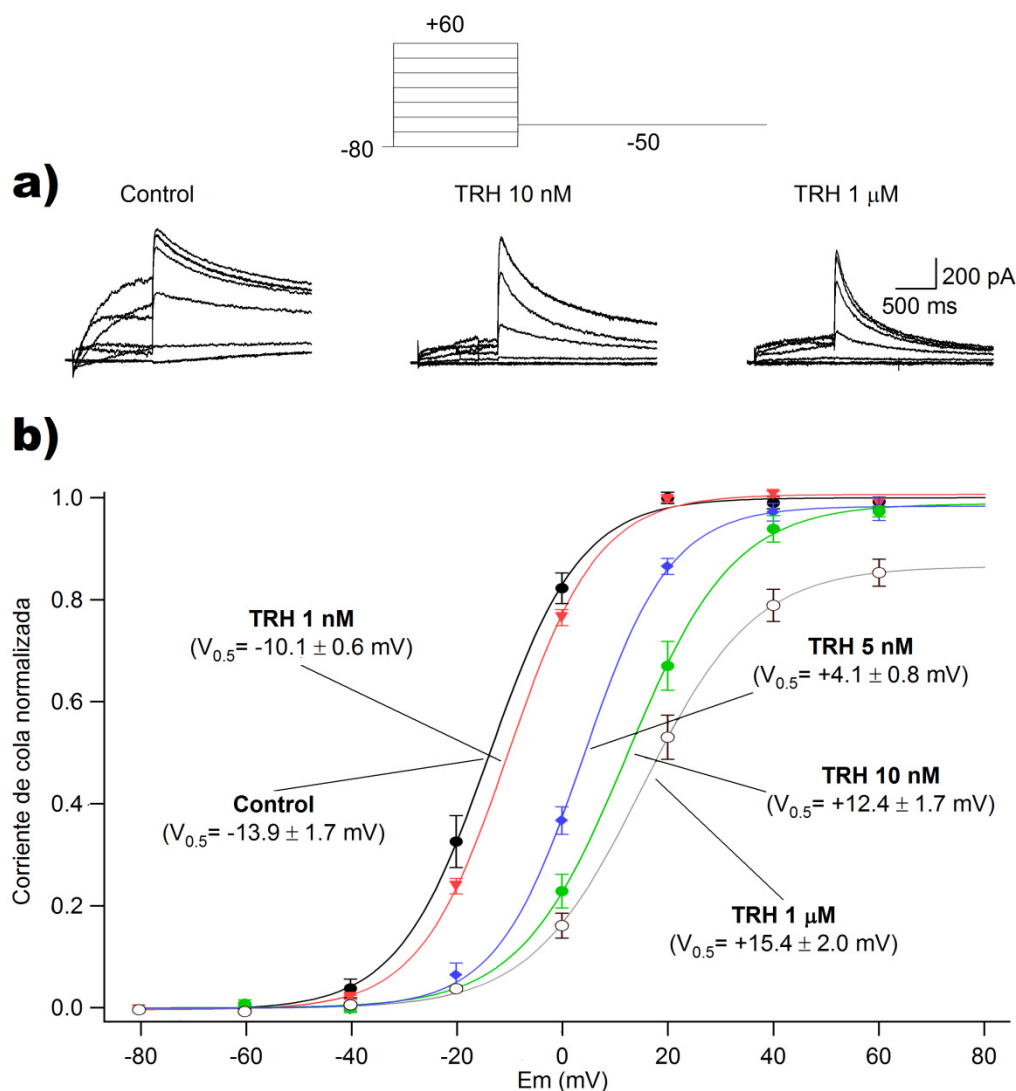
En células GH<sub>3</sub>, debido a la presencia en ellas de múltiples corrientes iónicas, se utiliza un medio extracelular con alta concentración de K<sup>+</sup> y libre de Ca<sup>2+</sup>, de modo que se eliminan las corrientes de Ca<sup>2+</sup> y se minimizan las corrientes de K<sup>+</sup> Ca-dependientes. Además, las corrientes de entrada fueron estudiadas mediante pulsos de hiperpolarización a -100 mV desde un voltaje basal de -10 mV, precedidos por una rampa de 100 ms desde 0 a -50 mV que da una estimación de la conductancia de la membrana dentro de ese rango de voltajes y además tiende a potenciar el efecto dependiente de voltaje de la TRH sobre rERG (Bauer *et al.* 1990; Barros *et al.* 1992, 1994, 1997). Finalmente, tras medir las corrientes de K<sup>+</sup> antes y después de la adición de TRH, se añadió una concentración relativamente elevada de E-4031 (5  $\mu$ M), que es un potente y específico inhibidor de los canales *erg*, lo que permite cuantificar de modo sustractivo la

magnitud de las corrientes rERG aisladas del resto de las de la célula, ya que sólo aquéllas son sensibles tanto a la TRH como al E-4031 (Gómez-Varela *et al.* 2003b; Miranda 2008, Tesis Doctoral). Como se puede ver en la Figura 16, la adición de concentraciones bajas (nM) de TRH produce ligeras inhibiciones en la corriente rERG de las células, mientras que la inhibición alcanza cotas cercanas al 80 % a la concentración de 1  $\mu$ M que usamos como control positivo de la inhibición. Para la cuantificación del efecto inhibitorio se añade finalmente una concentración de E-4031 capaz de producir un bloqueo total y específico de la corriente rERG, y por tanto limita la corriente remanente a la que no es mediada por dicho canal. Así, el efecto inhibitorio de la hormona es valorado calculando la fracción de la corriente rERG (i.e. la corriente total inicial menos la obtenida en presencia del fármaco, considerada como 100 %) que es bloqueada en respuesta a la TRH.

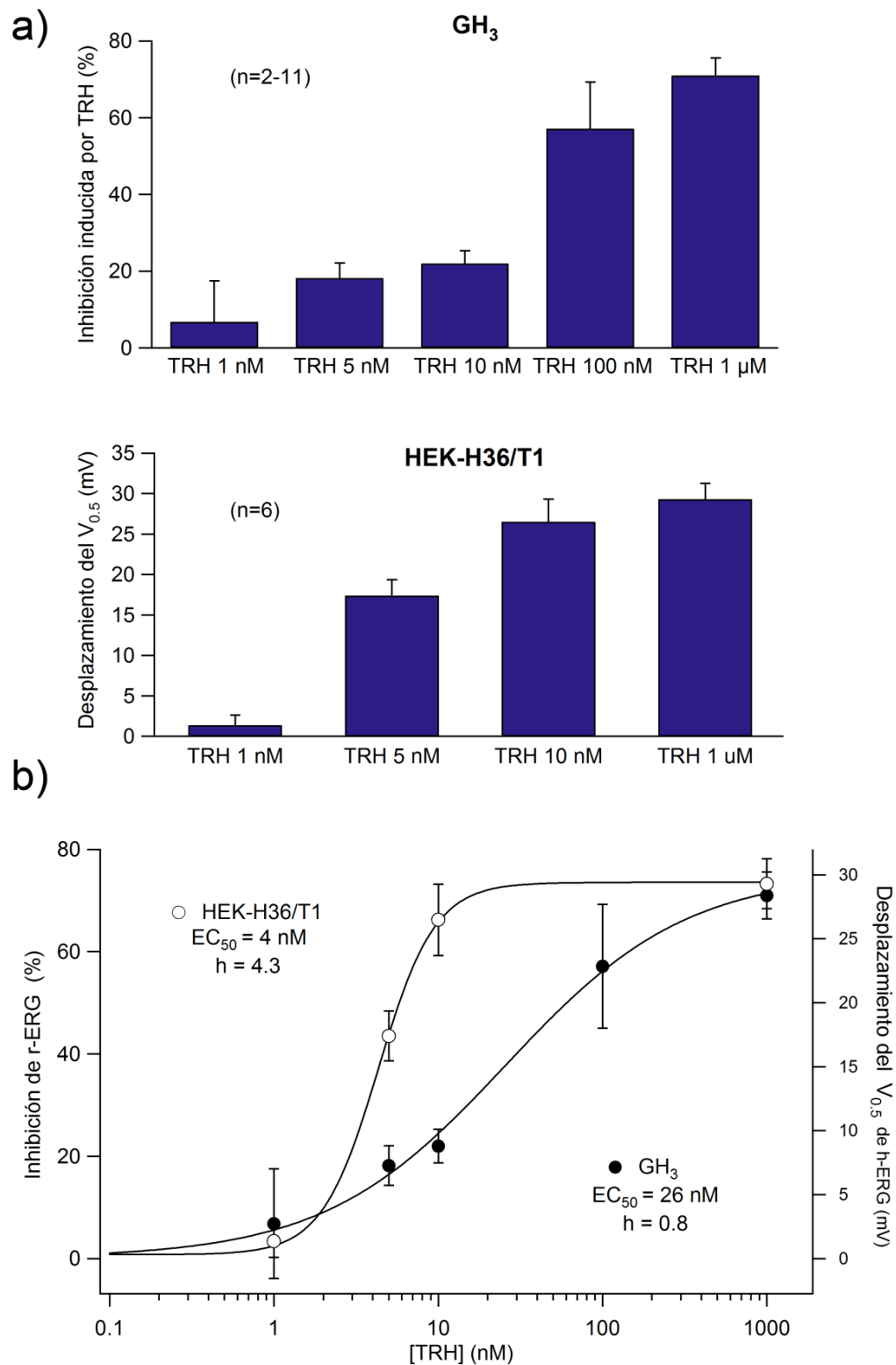
En cuanto a las células HEK-H36/T1, la medida del efecto de la TRH se realiza usando otro protocolo distinto al empleado en células GH<sub>3</sub> porque estas células sobre-expresan el canal hERG y por tanto las corrientes de K<sup>+</sup> que se registran son de mayor tamaño. Esto, unido a que en ellas no hay apenas otras corrientes, permite medir de forma directa las corrientes mediadas por hERG, sin necesidad de realizar un protocolo sustractivo como en el caso de las GH<sub>3</sub>. Así, el protocolo estándar seguido para el registro de las corrientes hERG consistió en la aplicación de pulsos de despolarización de 1 s entre +80 y -80 mV a intervalos de 20 mV desde un voltaje basal de -80 mV, seguidos de un periodo de repolarización de 2 s a -50 mV. Como ya hemos indicado, debido a las características especiales de hERG, el canal se abre durante la despolarización pero inmediatamente se inactiva, por lo que apenas se puede observar corriente durante los pulsos despolarizantes. Al repolarizar a -50 mV el canal vuelve desde inactivo a cerrado pasando por el estado abierto, dando lugar a una corriente de cola, mantenida durante bastante tiempo (hasta varios segundos) debido al lento cierre de hERG, y que aporta una medida inequívoca de la cantidad de canales abiertos (y rápidamente inactivados) durante la despolarización previa. De este modo se obtuvieron familias de corrientes como las mostradas en la Figura 17, de las que en base a la amplitud de la corriente en el pico inicial de la cola en función del voltaje de despolarización previo, se obtienen curvas I/V. Del ajuste de éstas a una ecuación de Boltzman ( $h(V) = I_{max} [1/(1+e^{(V-V_{0.5})/k})]$ ) es posible inferir la dependencia de voltaje de activación, definida de modo estándar mediante el voltaje al cual la activación es semimáxima ( $V_{0.5}$ ; Figura 17 b). Debido a la sobre-expresión del canal, las corrientes observadas en las células HEK-H36/T1 son de mayor tamaño que las registradas en las GH<sub>3</sub>, lo cual junto con la mayor facilidad para realizar registros electrofisiológicos en ellas las

#### 4. Resultados.

convierte en herramientas de estudio muy útiles. Como se puede apreciar en la Figura 17, el tratamiento con TRH produce varios efectos inhibitorios sobre la corriente hERG en estas células. Así, la hormona produce una reducción de la intensidad máxima de la corriente de cola (el pico inicial de salida de  $K^+$  al inicio de la repolarización), provoca una aceleración en la velocidad de cierre del canal (la velocidad a la que la corriente de cola desaparece) y causa un desplazamiento a la derecha de la  $V_{0.5}$ , cuya magnitud depende de la concentración de hormona añadida.



**Figura 17. Efecto de la TRH sobre la dependencia de voltaje de activación de las corrientes hERG en células HEK-H36/T1.** a) Familias de corrientes hERG en células HEK-H36/T1 en condiciones control y tras el tratamiento con diferentes concentraciones de TRH. Las corrientes fueron obtenidas en respuesta a pulsos de voltaje de 1 s entre -80 y +80 mV a intervalos de 20 mV desde un potencial basal de -80 mV, seguidos de un periodo de 2 s de repolarización a -50 mV tal y como se indica en el protocolo de despolarización de la parte superior. Nótese la clara aceleración de la velocidad de caída de la corriente de cola. b) Curvas I/V de hERG en células control y tratadas con diferentes concentraciones de TRH. Las líneas corresponden a las curvas de Boltzmann ( $h(V) = I_{max} [1/(1+e^{-(V-V_{0.5})/k})]$ ) que mejor se ajustan a los datos. Se indican los valores de voltaje (media  $\pm$  S.E.M.) a los que se alcanza la corriente semimáxima ( $V_{0.5}$ ) en cada caso.



**Figura 18. Dependencia de la concentración de TRH en las respuestas de los canales *erg* en células GH<sub>3</sub> y HEK-H36/T1.** a) En el gráfico superior se presenta el efecto sobre la inhibición de la corriente rERG de las células GH<sub>3</sub> en respuesta a las diferentes concentraciones de TRH indicadas. Los valores se corresponden a la media más el S.E.M. de las células analizadas. El gráfico inferior corresponde a la variación en la dependencia de voltaje de hERG inducida por diferentes concentraciones de TRH en células HEK-H36/T1. b) Comparación de la respuesta de *erg* a la TRH en células HEK-H36/T1 (círculos blancos) y GH<sub>3</sub> (círculos negros). Las líneas continuas corresponden a las curvas de Hill:  $y = \text{base} + (\text{max} - \text{base}) / [1 + (\text{EC}_{50}/x)^h]$  que mejor se ajustan a los datos. Los valores de EC<sub>50</sub> y de la pendiente obtenidos mediante este ajuste se indican en la gráfica.

#### 4. Resultados.

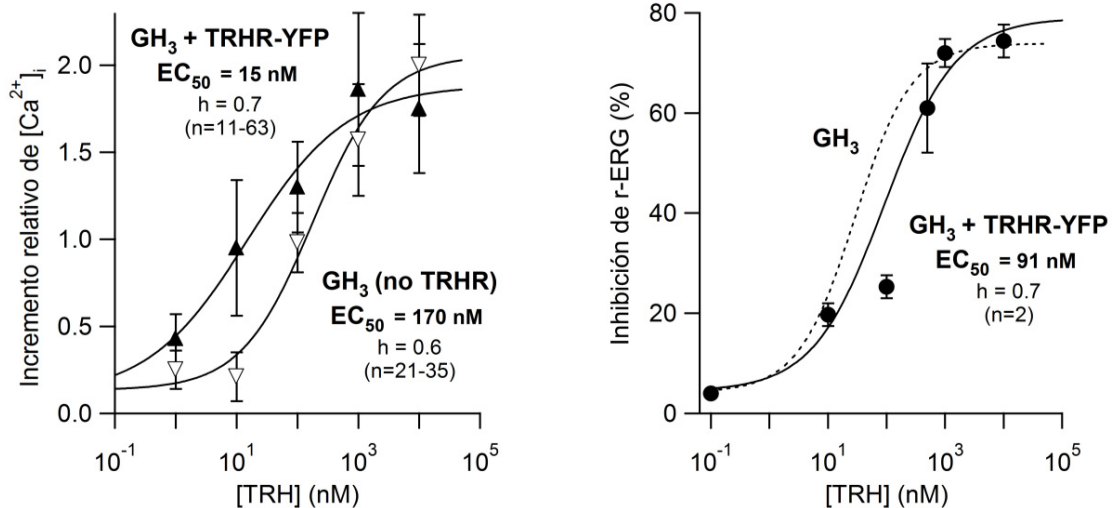
La comparación del efecto de la dependencia de la concentración de TRH sobre los canales *erg* en células GH<sub>3</sub> y HEK-H36/T1 se representa en la Figura 18. En las células GH<sub>3</sub>, los parámetros de la dependencia de la concentración para la inhibición por TRH de las corrientes rERG son muy similares a los observados previamente para el aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular (Figura 15), obteniéndose respectivamente valores de EC<sub>50</sub> de 26 nM y 80 nM. Sin embargo, la dependencia de la concentración hormonal para el desplazamiento de la dependencia de voltaje de activación de hERG en las células HEK-H36/T1 rinde un valor de EC<sub>50</sub> de 4 nM, mucho menor al observado para la respuesta de Ca<sup>2+</sup> tanto en esas células (EC<sub>50</sub> 270 nM; Figura 15) como en las GH<sub>3</sub>. Este cambio va acompañado también de un gran aumento en el valor de la pendiente de la curva de dosis-respuesta, que pasa de un coeficiente de Hill de 0,8 para GH<sub>3</sub> a uno de 4,3 en el caso de dependencia de voltaje de hERG, lo que hace además que el efecto máximo de la TRH en estas células se alcance ya a concentraciones de 10 nM (Figura 18), mientras que en células GH<sub>3</sub> se consigue a 1 μM.

##### 4.1.1.3. Efectos de la TRH en células GH<sub>3</sub> sobreexpresando el receptor de TRH.

Se ha descrito que la presencia de receptores "de repuesto" o "de reserva" (*spare receptors*) puede provocar que en algunas cascadas de señalización por receptores como el de TRH, tan sólo una fracción del total de receptores sea suficiente para activar al máximo la respuesta. Se cree que éste puede ser un mecanismo para optimizar la respuesta incluso a bajas concentraciones de agonista, que causaría además un claro incremento del coeficiente de Hill (Ramsdell y Tashjian 1986; Matthews 1993; Cleland y Linster 1999). Esto podría concordar con los datos obtenidos con las células HEK-H36/T1, en las que la esperable alta sobreexpresión del receptor de TRH podría ser la causa de la peculiar dependencia de la concentración hormonal que acabamos de mostrar (menor EC<sub>50</sub> y aumento en el coeficiente de Hill). Nótese sin embargo que, de ser así, tal diferencia en el número de receptores no parece afectar igualmente a los parámetros de la respuesta de Ca<sup>2+</sup>. Esto sugiere que no debe ser únicamente la presencia de receptores de reserva la razón de las diferencias observadas entre estos dos sistemas celulares respecto al efecto sobre los canales *erg*, lo que abre la posibilidad de que quizá la responsable de la distinta sensibilidad de éstos a la regulación por TRH pueda ser la presencia de diferentes componentes intracelulares en las rutas de señalización activadas en ambos tipos celulares.

Para descartar que el mayor número de receptores fuera la causa de las diferencias en la modulación de *erg*, estudiamos la dependencia hormonal de las respuestas de Ca<sup>2+</sup> y de rERG

en células GH<sub>3</sub> en las que el número de TRHR se incrementó mediante la transfección transitoria de un receptor completamente funcional etiquetado con YFP en su extremo carboxilo. El uso de un receptor marcado nos permite identificar las células que han sido efectivamente transfectadas y en las que además el TRHR se está expresando abundantemente.



**Figura 19. Dependencia de la concentración hormonal en las respuestas a la TRH en células GH<sub>3</sub> que sobreexpresan TRHR.** A la izquierda se muestran las curvas dosis-efecto de la respuesta de liberación de Ca<sup>2+</sup> intracelular en células transfectadas con TRHR (triángulos negros) y en células no transfectadas (triángulos blancos). A la derecha se representa la inhibición de la corriente rERG inducida por diferentes concentraciones de TRH en células GH<sub>3</sub> transfectadas con TRHR. La línea punteada corresponde a los datos obtenidos en células GH<sub>3</sub> sin transfectar mostrados en la Fig. 16. Las líneas continuas corresponden a curvas de Hill:  $y = \text{base} + (\text{max} - \text{base}) / [1 + (\text{EC}_{50}/x)^h]$  que mejor se ajustan a los datos. Los valores del ajuste y el número de células ensayadas a cada concentración se muestran en la gráfica.

La medida de la respuesta de Ca<sup>2+</sup> se realizó de forma similar a la indicada anteriormente, pero en este caso se midió la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular de las células que presentaban fluorescencia de YFP y por otro lado, en el mismo experimento, la de las células que no expresaban el receptor etiquetado. Como cabía esperar, la presencia de un mayor número de receptores produce un cierto desplazamiento hacia concentraciones menores de TRH de la curva dosis/respuesta de la liberación de Ca<sup>2+</sup> intracelular, obteniéndose un EC<sub>50</sub> de 170 nM en las células que no sobre-expresan TRHR frente a un EC<sub>50</sub> de 15 nM en las células que expresaban el receptor etiquetado (Figura 19). No obstante, y a pesar de este desplazamiento, el coeficiente de Hill no varía de forma significativa entre ambas curvas. Por otro lado al estudiar la dependencia de la concentración del efecto de la TRH sobre la inhibición de la corriente rERG, se observa que en las células GH<sub>3</sub> sobre-expresando TRHR, no se produce casi variación respecto a la observada en células GH<sub>3</sub> sin transfectar (EC<sub>50</sub> de 91 nM y 26 nM), ni el coeficiente de Hill (h = 0,7 y 0,8) parece verse afectado por la presencia en las células de un

#### 4. Resultados.

mayor número de receptores (Figura 19). Por lo tanto, estos datos indican que, aparte de la presencia de un mayor número de receptores de TRH, las diferencias observadas en las células HEK-H36/T1 respecto a las GH<sub>3</sub> han de estar relacionadas con la distinta presencia o intervención de algún otro componente de las rutas de señalización activadas en cada tipo celular.

#### 4.1.2. Efecto de los secuestradores de dímeros $\beta\gamma$ de proteínas G sobre las respuestas inducidas por la TRH.

Trabajos previos de nuestro laboratorio dirigidos a estudiar la implicación de las proteínas G heterotriméricas en las respuestas inducidas por la TRH, han sugerido la posibilidad de que los dímeros  $\beta\gamma$  liberados por alguno de dichos transductores sean realmente los componentes esenciales en la modulación de los canales *erg*, al menos en el caso del sistema nativo constituido por las células GH<sub>3</sub> (Miranda *et al.* 2005). Los datos, obtenidos inicialmente usando  $\alpha$  transducina, un agente capaz de secuestrar dímeros  $\beta\gamma$  libres en la célula, indicaron asimismo la posible existencia de diferencias en función del tipo celular estudiado y quizá también en relación con el parámetro cinético analizado. Por todo ello, decidimos estudiar en más profundidad estos aspectos, comenzando por confirmar el posible papel de los dímeros  $\beta\gamma$ , mediante la utilización de otros agentes de eficacia contrastada como secuestradores de los mismos. Así, en primer lugar comprobamos el posible efecto que sobre la modulación de hERG por TRH tenía la fosducina (PDC), un conocido secuestrador de dímeros  $\beta\gamma$  debido a su elevada afinidad por éstos (Blüml *et al.* 1997). Para ello abordamos estudios electrofisiológicos mediante la técnica de *patch clamp* de nuevo en la modalidad de parche perforado, comenzando con células HEK-H36/T1 transfectadas con 4  $\mu$ g del plásmido pcDNA3.1/Hygro que contenía la secuencia codificante para la fosducina bovina (ver Métodos) y co-transfectadas con 0,5  $\mu$ g de pEGFP como marcador de transfección. Solo las células que expresaban proteína fluorescente verde fueron usadas para los registros electrofisiológicos.

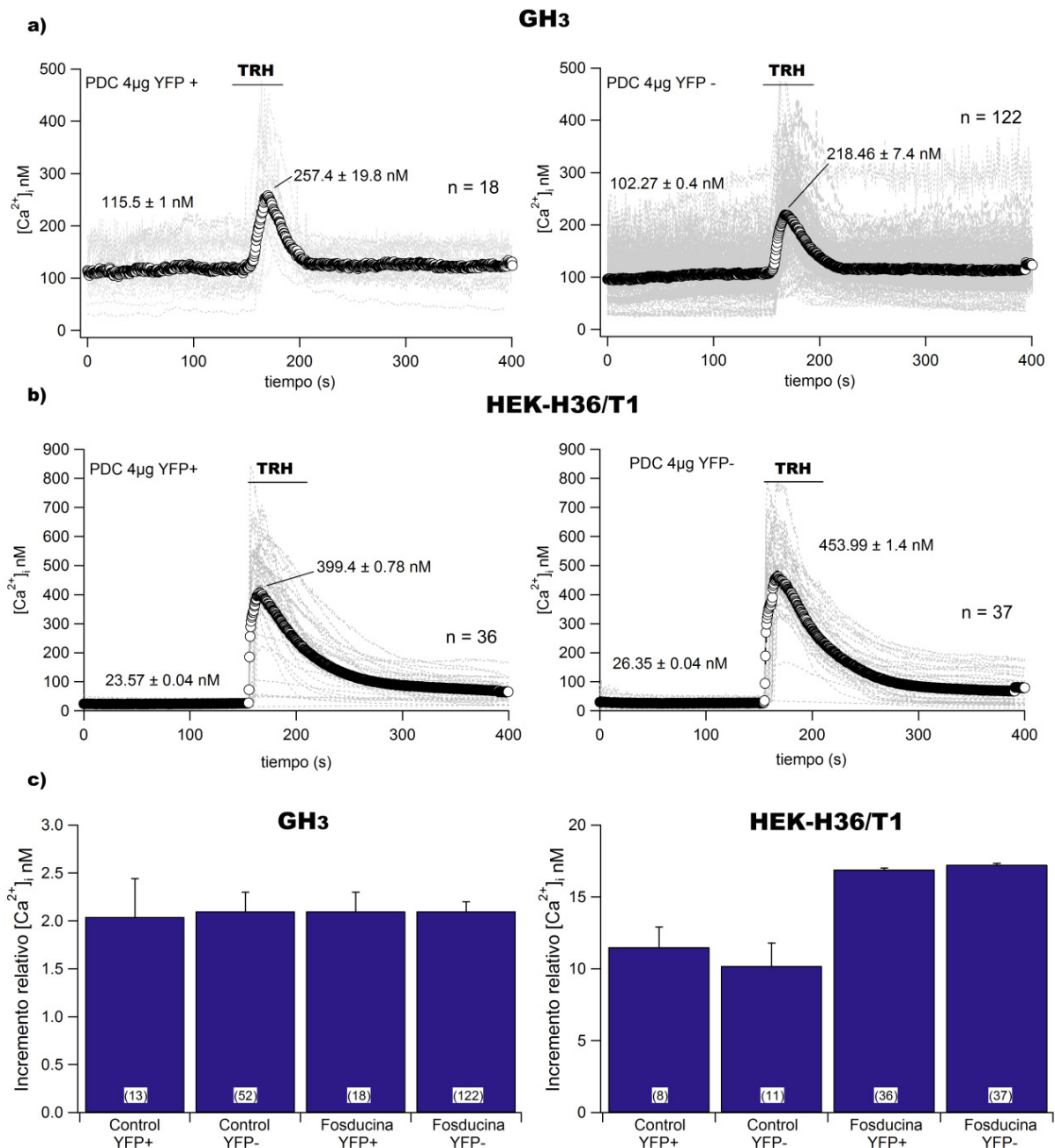
Aunque algunos datos preliminares de nuestro laboratorio apuntaban ya a que el tratamiento con PDC era capaz de disminuir la inhibición de la corriente de rERG inducida por TRH en las células GH<sub>3</sub>, no había datos acerca del efecto de la PDC sobre la liberación de calcio intracelular o la inhibición de la corriente de hERG en las células HEK-H36/T1. Como se ilustra en la Figura 20, al comparar las variaciones en la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup> inducidas por la TRH en células GH<sub>3</sub> efectivamente transfectadas (i.e mostrando fluorescencia de YFP) con las inducidas en células que aparentemente no habían sido transfectadas (ya que no

expresaban YFP), observamos que la hormona provocaba un incremento relativo de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular similar en ambos casos ( $2,1 \pm 0,2$  veces y  $2,1 \pm 0,1$  veces, respectivamente). Estos valores fueron similares asimismo a los observados en células GH<sub>3</sub> control transfectadas únicamente con YFP ( $2,04 \pm 0,4$  veces) (Figura 20 a y c). Por tanto la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular inducida por TRH en las células GH<sub>3</sub> permanece inalterada tras la transfección de las mismas con PDC. Por su parte, en las células HEK-H36/T1 se obtuvieron resultados similares al estudiar la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  a la TRH. Así, en este caso, la TRH produjo un aumento de  $16,9 \pm 0,1$  veces en células transfectadas con PDC y que expresaban fluorescencia de YFP, frente a las  $17,23 \pm 0,1$  veces observadas en las células que no expresaban el marcador de transfección, valores ligeramente superiores aunque comparables a los registrados con células control transfectadas únicamente con YFP (Figura 20). Por tanto, y al igual que en las células GH<sub>3</sub>, la presencia de PDC en las células no altera la Fase I de respuesta a la TRH en las células HEK-H36/T1.

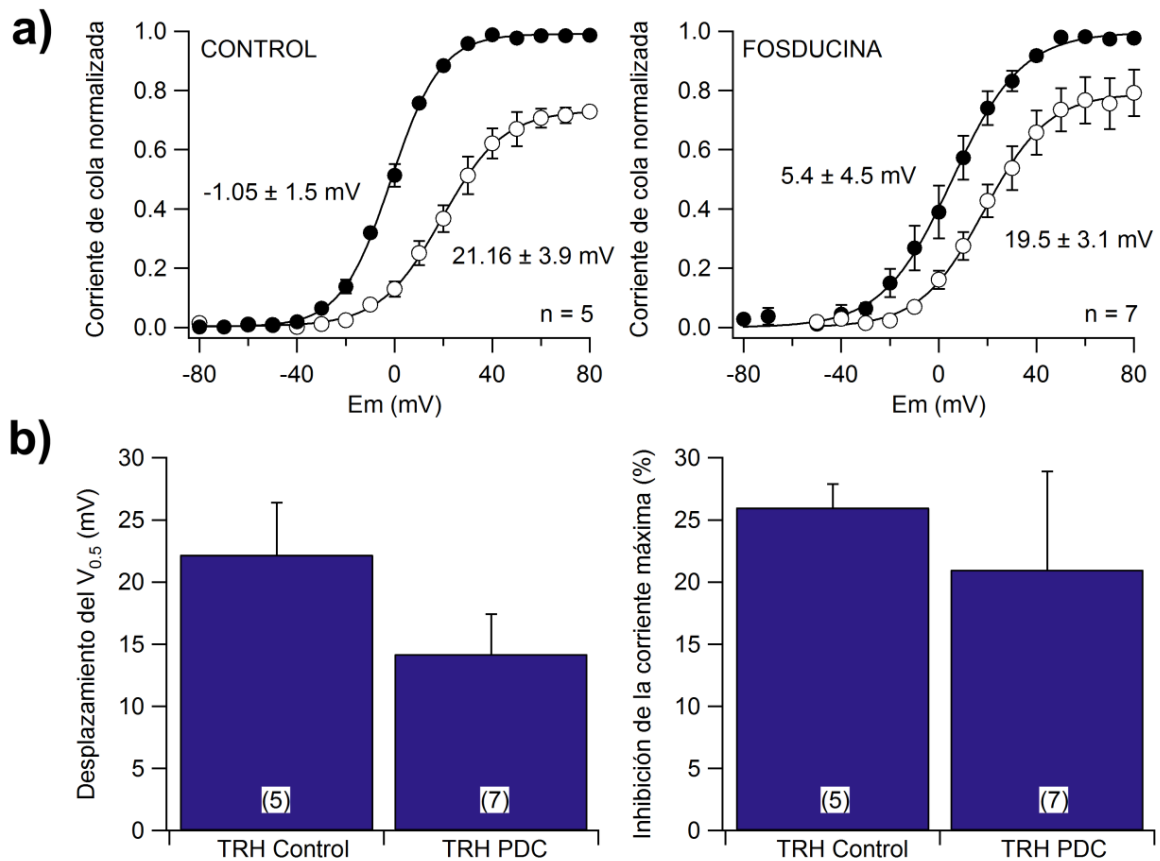
Como hemos comentado, datos previos de nuestro laboratorio parecían indicar que el tratamiento con PDC era capaz de reducir la inhibición de la corriente de rERG inducida por la TRH en las células GH<sub>3</sub> (Carretero *et al.* 2012). Sin embargo carecíamos de datos respecto al efecto de la fosducina sobre la modulación del canal hERG por la hormona en células HEK-H36/T1. Se realizaron por tanto estudios de *patch clamp* en la modalidad de parche perforado sobre células transfectadas con 4  $\mu\text{g}$  del plásmido pcDNA3.1/Hygro con la secuencia codificante de la PDC y usando como marcador de transfección 0,5  $\mu\text{g}$  de pEGFP-C1, seleccionando para los registros aquellas células que expresaban la proteína fluorescente y que por tanto habían sido transfectadas eficientemente. Los datos obtenidos en estos experimentos muestran que en las células transfectadas con PDC, la TRH a una concentración de 1  $\mu\text{M}$  produce un desplazamiento en la dependencia de voltaje de activación de hERG de  $14,2 \pm 3,2$  mV, frente al  $22,2 \pm 2$  mV observado en las células control no transfectadas (Figura 21). No obstante, esta disminución del efecto de la TRH en las células transfectadas no resultó estadísticamente significativa. En cuanto a la inhibición de la corriente máxima de cola inducida por la TRH, en las células transfectadas con PDC la reducción alcanzó un  $21 \pm 7,9$  %, un valor análogo al  $26 \pm 1,9$  % observado en las células control (Figura 21). Por tanto, al menos en las células HEK-H36/T1, la presencia de la fosducina no fue capaz de alterar significativamente el efecto modulador del canal hERG por la TRH sobre ninguno de los dos parámetros electrofisiológicos estudiados.



#### 4. Resultados.



**Figura 20. Efecto de la fosducina sobre la liberación de  $Ca^{2+}$  intracelular inducida por TRH.** a-b) Se muestra el desarrollo temporal de los registros de  $Ca^{2+}$  en células GH<sub>3</sub> (a) y HEK-H36/T1 (b), en ambos casos transfectadas con 4 µg del plásmido pcDNA3.1/Hygro con la secuencia codificante de la PDC y 0,5 µg de pEYFP-N1 como marcador de transfección. Los paneles de la izquierda y la derecha corresponden a las subpoblaciones celulares que expresan o no el marcador de transfección (YFP), respectivamente. Se indican los valores medios de la  $[Ca^{2+}]_i$  antes y después de la adición de TRH 1 µM y el número de células en las que se registro la  $[Ca^{2+}]_i$ . c) Histogramas obtenidos a partir de los datos de los experimentos mostrados en a-b, así como de experimentos control realizados previamente en ausencia de fosducina. Los valores corresponden a los incrementos relativos de la  $[Ca^{2+}]_i$  tras la adición de TRH para cada condición estudiada. Los datos reflejan la media más el S.E.M con el número de células promediadas indicado entre paréntesis.



**Figura 21. Efecto de la transfección con fosducina sobre la modulación de hERG por la TRH en células HEK-H36/T1.** a) En la parte superior se representan curvas I/V en células control y transfectadas con pCDNA3.1/Hygro + fosducina, obtenidas antes (puntos negros) y después (círculos blancos) de la adición de TRH 1  $\mu\text{M}$ . Las líneas corresponden a las curvas de Boltzmann ( $h(V) = I_{\text{max}} [1/(1+e^{(V-V_{0.5})/k})]$ ) que mejor se ajustan a los datos. Se indican los valores de voltaje a los que se alcanza la corriente semimáxima ( $V_{0.5}$ ) y el número de células estudiadas en cada caso. b) Comparación de los valores medios  $\pm$  S.E.M. del desplazamiento de la  $V_{0.5}$  (izquierda) y de la reducción del valor máximo de la corriente de cola (derecha) inducidos por la TRH.

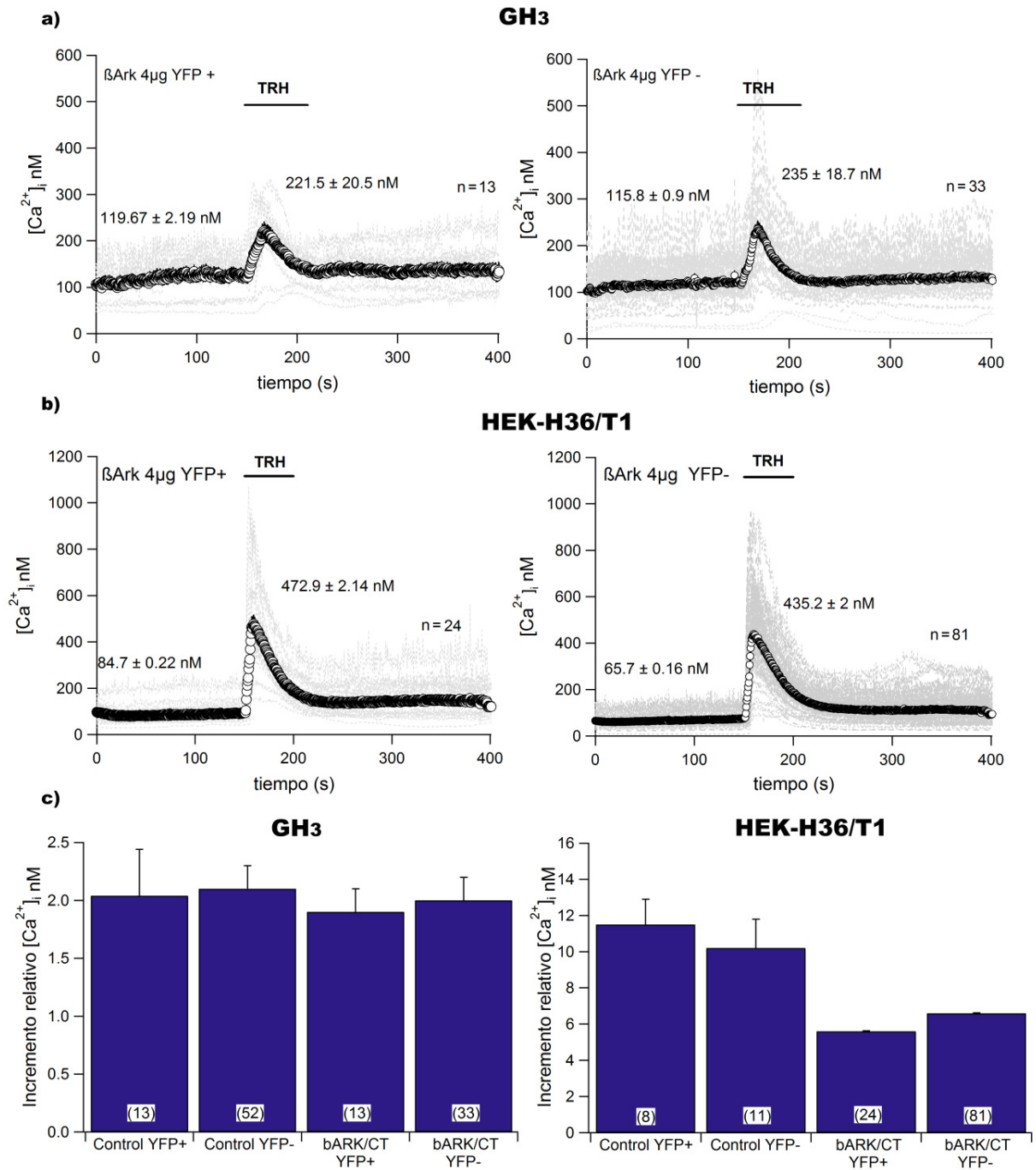
Con el fin de confirmar de forma definitiva los resultados obtenidos con la transducina (Miranda *et al.* 2005) y la PDC sobre la existencia o no de diferencias en las rutas de transducción, así como para completar los estudios previos realizados en nuestro laboratorio, utilizamos otro secuestrador de dímeros  $\beta\gamma$ : el extremo carboxilo de la quinasa del receptor  $\beta$ -adrenérgico ( $\beta\text{ARK/CT}$ ), que es capaz de unir y secuestrar los dímeros  $\beta\gamma$  que quedan libres tras disociarse de la subunidad  $G\alpha$  de las proteínas G heterotriméricas. Si bien ya habíamos estudiado el efecto de este secuestrador sobre la inhibición de los canales *erg* inducida por la TRH tanto en células  $\text{GH}_3$  como en HEK-H36/T1 (Miranda 2008, Tesis Doctoral), carecíamos de información acerca de su posible efecto sobre la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en ambos tipos celulares. Así, análogamente a lo descrito anteriormente con la PDC, la presencia de  $\beta\text{ARK/CT}$  en las células era capaz de reducir el efecto de la TRH sobre rERG en las células  $\text{GH}_3$ , pero no afectaba a la modulación de hERG en las HEK-H36/T1. Con el fin de completar estos estudios,

#### 4. Resultados.

analizamos pues en ambos tipos celulares el efecto de  $\beta$ ARK/CT sobre la Fase I de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en respuesta a la TRH.

El método usado para los registros de  $\text{Ca}^{2+}$  fue el mismo que el descrito en el caso de la PDC, utilizando células transfectadas con 4  $\mu\text{g}$  del plásmido pREP4 conteniendo  $\beta$ ARK/CT (ver Métodos) y cotransfectadas con 0,5  $\mu\text{g}$  de pEYFP-N1 como marcador de transfección. En las células GH<sub>3</sub>, al igual que ocurría tras el tratamiento con PDC, los cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular inducidos por TRH fueron similares a los observados en células control, produciéndose esta vez un incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  de  $1,9 \pm 0,2$  veces en las células positivas para el marcador de transfección y de  $2 \pm 0,2$  veces en las células que no presentaban fluorescencia de eYFP, unos valores asimismo similares a los de las células control sin transfectar ( $2,1 \pm 0,2$  veces) (

Figura 22). Por su parte, en el caso de las células HEK-H36/T1 transfectadas con  $\beta$ ARK/CT, la TRH produjo un incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular de  $5,6 \pm 0,03$  veces en las células que expresaban el marcador de transfección y de  $6,6 \pm 0,03$  veces en las que no lo expresaban. Estos valores fueron algo inferiores a los observados en las células control sin transfectar ( $11,4 \pm 1,3$  veces) (Figura 22). No obstante, el hecho de que el efecto de la TRH sea análogo en células con y sin el marcador de transfección (en las segundas se esperarían niveles comparables a los de células control), indica que las diferencias seguramente se deben a la variabilidad en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  basal de las propias células HEK-H36/T1 y no a un efecto relacionado con el tratamiento con  $\beta$ ARK/CT. Así pues, parece evidente que la diferencia en el comportamiento de las células GH<sub>3</sub> y HEK-H36/T1 respecto a la inhibición hormonal de las corrientes *erg* en presencia de los secuestradores de dímeros  $\beta\gamma$  se ciñen solamente a ese efecto, ya que no se manifiesta igualmente en las respuestas de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidas por la TRH en ambos tipos celulares.



**Figura 22. Efecto de la transfección con  $\beta$ ARK/CT sobre la liberación de  $Ca^{2+}$  intracelular inducida por TRH.** a-b) Desarrollo temporal de los registros de  $Ca^{2+}$  en células GH<sub>3</sub> (a) y HEK-H36/T1 (b), transfectadas con 4  $\mu$ g del plásmido pREP4 conteniendo la secuencia codificante de  $\beta$ ARK/CT y 0,5  $\mu$ g de pEYFP-N1 como marcador de transfección. Los paneles de la izquierda y la derecha corresponden a las subpoblaciones celulares que expresan o no el marcador de transfección (eYFP), respectivamente. Se indican los valores medios de la  $[Ca^{2+}]_i$  antes y después de la adición de TRH 1  $\mu$ M y el número de células registradas. c) Histogramas obtenidos a partir de los datos de los experimentos mostrados en a-b y de controles realizados previamente, indicando los incrementos relativos de la  $[Ca^{2+}]_i$  tras la adición de TRH para cada condición estudiada. Los datos se muestran como la media más S.E.M con el número de células promediadas indicado entre paréntesis.

#### 4. Resultados.

### **4.2. Estudios sobre la participación de quinasas específicas en las rutas de señalización entre el receptor de TRH y los canales *erg*.**

#### **4.2.1. Estudio de la posible implicación de PKB/Akt en la ruta de señalización.**

En el año 2003 se describió que la proteína quinasa B (también conocida como Akt) era necesaria para el funcionamiento correcto de los canales hERG en células HEK293 transfectadas con dichos canales, puesto que el tratamiento con wortmanina (inhibidor de PI3K) o con un dominante negativo de PI3K disminuían la corriente hERG basal en dichas células, mientras que la transfección con PI3K constitutivamente activa aumentaba ligeramente la misma (Zhang *et al.* 2003). Por otro lado, en nuestro laboratorio se había observado que el tratamiento con wortmanina no modificaba significativamente la inhibición de la corriente *erg* inducida por TRH en células GH<sub>3</sub> (Gómez-Varela *et al.* 2003b). Sin embargo, dado que se ha descrito que en algunos casos Akt puede estar activa de forma independiente a PI3K (Song *et al.* 2005), nos pareció conveniente estudiar más a fondo el efecto de la disminución de la actividad de Akt sobre la respuesta de los canales *erg* a TRH en ambos tipos celulares.

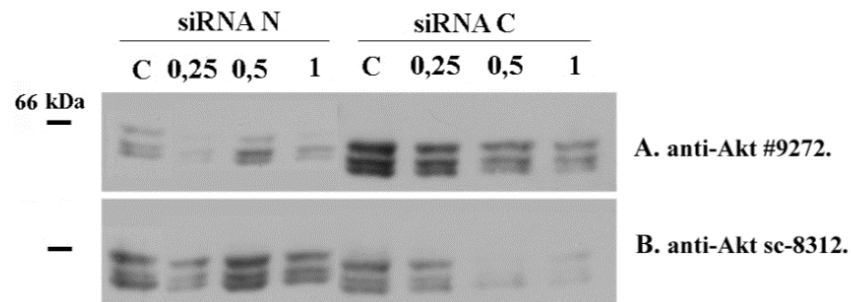
##### **4.2.1.1. Estudio de la posible implicación de Akt/PKB en células HEK-H36/T1.**

Para estudiar la posible implicación de Akt en los efectos de la TRH optamos por utilizar en primer lugar un enfoque de silenciamiento génico mediante siRNAs contra la proteína Akt tanto de hombre como de rata. Para realizar este silenciamiento usamos dos sistemas alternativos: i. mezclas de siRNAs preparadas con el enzima Dicer a partir de dsRNA con la secuencia de zonas escogidas del cDNA correspondiente, y ii. siRNAs individuales dirigidos contra dianas específicas de los mRNAs, y diseñados mediante aplicaciones informáticas al uso.

###### **4.2.1.1.1. Silenciamiento con mezclas de siRNAs de la expresión endógena de las isoformas de Akt humano en células HEK-H36/T1.**

Para determinar el efecto que causaban las mezclas de siRNAs preparadas a partir del cDNA de hAkt1, medimos la expresión de Akt a nivel de proteína en células HEK-H36/T1. Como se ha apuntado en la introducción, existen tres genes que codifican sendas isoformas de Akt en células humanas: Akt1 (65 KDa), Akt2 (60 KDa) y Akt3 (58 KDa). Para poder determinar la sensibilidad de cada una de ellas al silenciamiento mediante las mezclas de siRNAs, adecuamos convenientemente las condiciones experimentales. Así, para discernir entre las tres isoformas cargamos 200 µg de proteína de extracto celular por calle y utilizamos un maxigel de SDS-

poliacrilamida al 8 %, gracias al cual se pueden separar las proteínas con una mayor resolución en el rango de tamaños que nos interesa. En la Figura 23 se muestra uno de estos análisis, en el que se pueden comparar los efectos de las mezclas de siRNAs amino y carboxilo sobre la proteína Akt endógena. Para este experimento se transfectaron células HEK-H36/T1 con 0, 0,25, 0,5 y 1  $\mu\text{g}$  de las mezclas de siRNAs amino o carboxilo, Las células se recogieron 48 h después de la transfección y se procedió a su análisis western con dos anticuerpos anti-Akt diferentes.



**Figura 23. Efecto de las mezclas de siRNAs amino y carboxilo contra hAkt1 sobre la expresión de las isoformas endógenas de Akt.** Células HEK-H36/T1 fueron transfectadas sin (calles C) o con 0,25, 0,5 y 1  $\mu\text{g}$  de la mezcla de siRNAs indicada. Los extractos celulares (200  $\mu\text{g}$  de preteína por calle) fueron separados en un maxigel de SDS-PAGE al 8 %, transferidos a una membrana de PVDF, y sometidos a dos análisis western sucesivos empleando anticuerpos anti-Akt #9272 (A) y sc-8312 (B).

En la Figura 23 se aprecia que en estas condiciones de análisis electroforético se pueden separar claramente las bandas correspondientes a las tres isoformas endógenas de Akt de células humanas. De acuerdo con los pesos moleculares antes indicados, la de mayor tamaño debe corresponder a Akt1, y las de tamaño menor a Akt2 y Akt3 en orden decreciente. A simple vista puede apreciarse que tanto la mezcla amino como la carboxilo provocan un bloqueo de la expresión de las tres isoformas de Akt endógeno incluso en células transfectadas con 0,25  $\mu\text{g}$  de mezcla, bloqueo que resulta más evidente al aumentar la cantidad de mezcla transfectada. Respecto a la mayor efectividad de una u otra mezcla, se observa que la carboxilo es más efectiva que la amino, aunque el uso de anticuerpos anti-Akt de las dos casas comerciales sobre la misma membrana evidencia algunas diferencias inesperadas de detección en las bandas de Akt. Estas diferencias, por su carácter poco uniforme parecen tener origen en más de un aspecto técnico que esté afectando a la unión de los anticuerpos. A pesar de esta disparidad de detección, resulta evidente que tanto la mezcla de siRNAs amino como la carboxilo producen un bloqueo efectivo de la expresión de las tres isoformas endógenas de Akt, y que el efecto es mayor cuando se usa la carboxilo que cuando se usa la amino. Así, el bloqueo de la expresión es muy evidente usando cantidades de 0,5 ó 1,0  $\mu\text{g}$  de mezcla carboxilo, si bien su cuantía es difícil

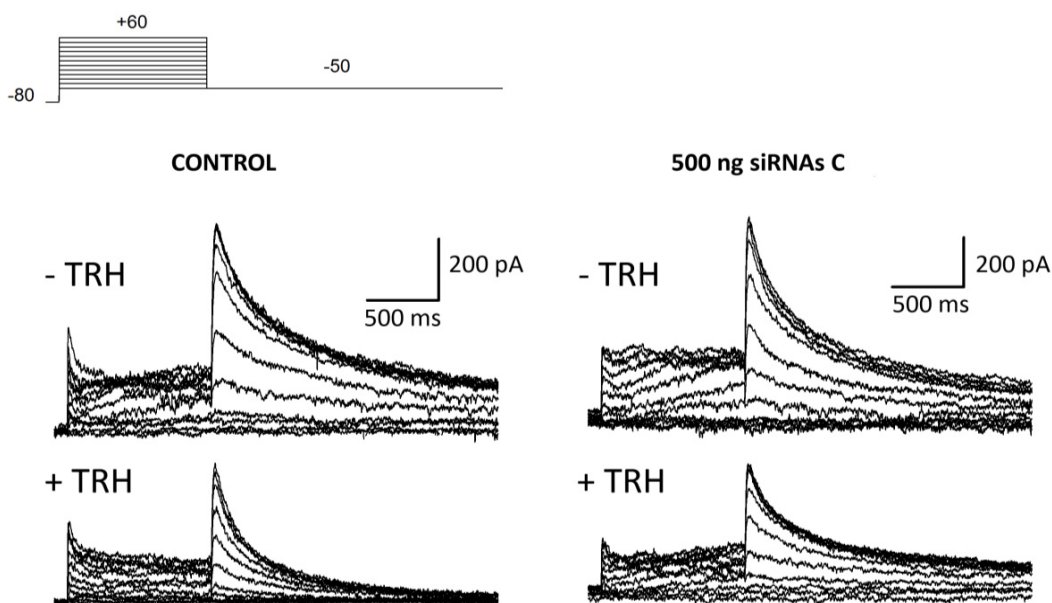
#### 4. Resultados.

de precisar por el problema de detección mencionado y por la ausencia en el western de una proteína como control de referencia para cada calle. En todo caso, en adelante se usó solo esa mezcla para los experimentos de estudios funcionales.

##### **4.2.1.1.2. Efecto del silenciamiento de Akt con mezclas de siRNAs sobre la modulación de hERG por TRH en células HEK-H36/T1.**

Una vez puesto a punto nuestro sistema de silenciamiento de Akt abordamos el estudio del efecto de tal silenciamiento a un nivel funcional, específicamente sobre la modulación hormonal de los canales hERG por TRH. Dado que las células HEK-H36/T1 constituyen un modelo que presenta mejores características técnicas que las GH<sub>3</sub>, comenzamos estudiando en ellas la posible participación de Akt en la ruta de regulación del canal hERG por TRH. Para ello se realizaron medidas electrofisiológicas con células HEK-H36/T1 transfectadas con diferentes cantidades de las mezclas de siRNAs y con 1 µg de plásmido pEGFP-C1 como control positivo de transfección. Las medidas sólo se efectuaron en células con fluorescencia de eGFP, que por tanto habían sido apropiadamente transfectadas. Ya que los siRNAs están en una proporción molar muy elevada respecto al plásmido de la eGFP (1 µg de plásmido de 4700 pb frente a 0,25 ó 0,5 µg de siRNAs de 21 pb), la presencia de eGFP en la célula prácticamente asegura que los siRNAs han sido asimismo co-transfectados.

Los datos mostrados en la Figura 24 indican que, como se ha descrito previamente (ver Figura 17), en las células sin tratar con los interferentes la adición de TRH origina una disminución de la magnitud máxima de las corrientes de cola a -50 mV y una clara aceleración de la velocidad a la que desaparecen dichas corrientes. Es importante resaltar que las células tratadas con los siRNAs para hAkt1 mostraron una densidad de corriente significativamente menor [ $30,6 \pm 5$  pA/pF (n = 12) y  $19,4 \pm 3$  pA/pF (n = 3) en presencia de 250 y 500 ng de siRNAs, respectivamente] que las células sin tratar [ $57,9 \pm 8,4$  pA/pF (n = 5);  $p < 0,01$  y  $p < 0,001$  vs 250 y 500 ng de siRNAs]. Estos datos confirman los resultados descritos previamente con un dominante negativo de Akt, indicando que la presencia de la quinasa en las células HEK293 es importante para el correcto funcionamiento de hERG en condiciones basales (Zhang *et al.* 2003). Asimismo, aportan una prueba funcional adicional de que los interferentes están actuando apropiadamente y minimizando el nivel celular de la quinasa.



**Figura 24. Influencia del tratamiento con la mezcla de siRNAs C contra hAkt sobre el efecto de la TRH en las corrientes hERG de las células HEK-H36/T1.** La respuesta a la TRH 1  $\mu$ M se estudió sobre corrientes obtenidas tras despolarizaciones a distintos voltajes siguiendo el protocolo indicado en la parte superior izquierda, utilizando células control (izquierda) o transfectadas 48 h antes con 0,5  $\mu$ g de la mezcla de siRNAs carboxilo (derecha). Las corrientes corresponden a una célula representativa en cada caso. La adición de la hormona se realizó 2 min antes del comienzo del protocolo indicado, una vez obtenidas las corrientes control sin hormona. Los pulsos fueron aplicados a intervalos de 30 – 40 s.

Los datos mostrados en la

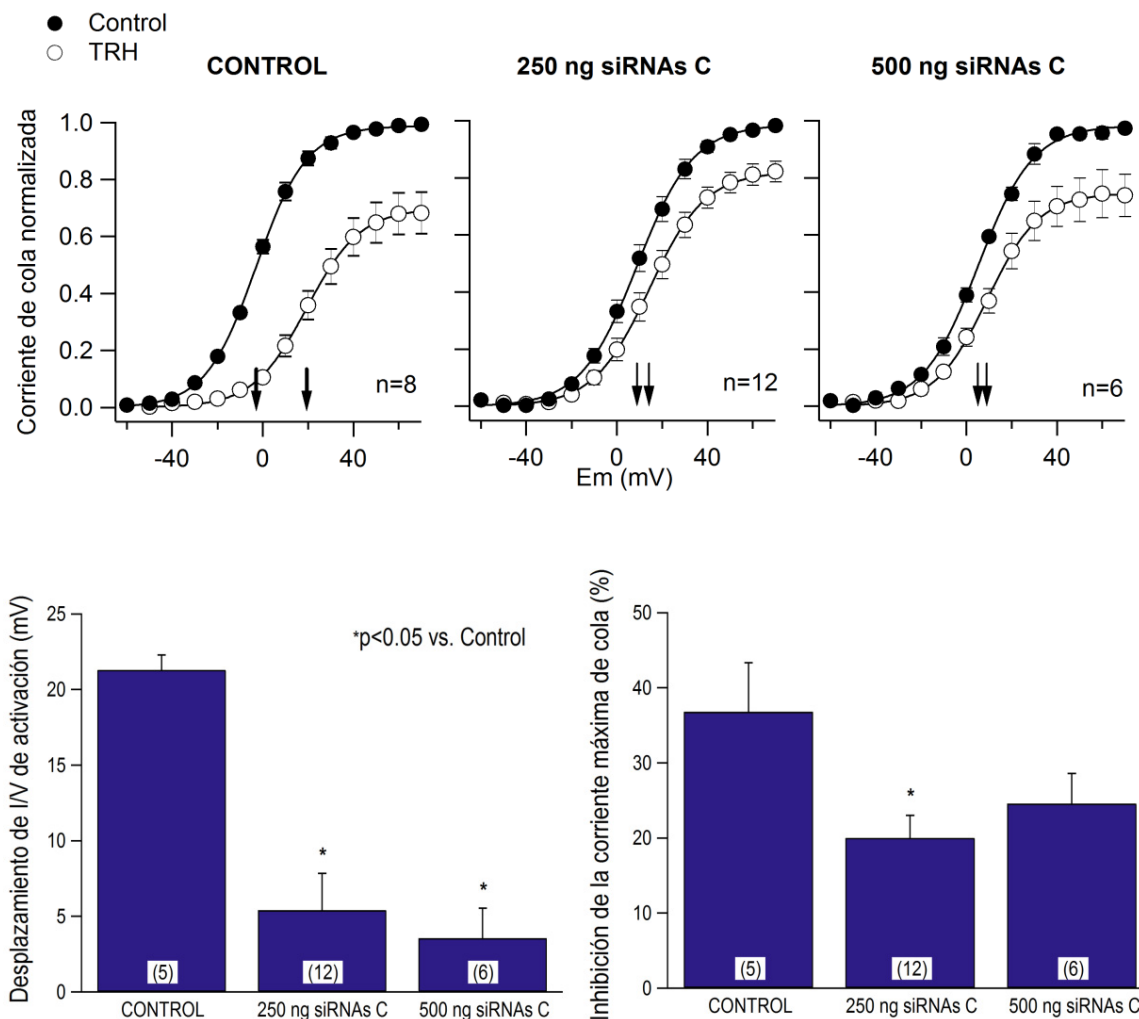
Figura 24 incluyen asimismo los efectos de la TRH sobre las corrientes en las células tratadas con siRNAs. Por su parte, el análisis cuantitativo de cómo afecta el tratamiento con los siRNAs al desplazamiento de la dependencia de voltaje de activación causado por la TRH, realizado a partir de corrientes como las mostradas en la

Figura 24, se muestra en la Figura 25. Se observa que la TRH provoca en las células control un desplazamiento de la dependencia de voltaje que se manifiesta como un incremento en el valor del  $V_{0,5}$  de  $+21,3 \pm 1$  mV ( $n = 8$ ). Ese desplazamiento es claramente menor en las células tratadas con 250 ng de siRNAs carboxilo ( $+ 5,4 \pm 2,42$  mV, ( $n = 12$ )  $p < 0,05$ ), y aún más reducido en las que recibieron 500 ng de ellos ( $+ 3,55 \pm 1,98$  mV, ( $n = 6$ )  $p < 0,05$ ). Como se observa en la Figura 25, también estudiamos el efecto de los siRNAs sobre la reducción por la TRH de la corriente máxima de cola. Tanto en ausencia como en presencia de interferentes la magnitud máxima de las corrientes disminuye al tratar las células con TRH, siendo esta inhibición de un  $36,2 \pm 4,4$  % ( $n = 8$ ) en las células control. El análisis estadístico de los datos indica que, si bien en las células tratadas con ambas cantidades de siRNAs la reducción de las corrientes fue menor, esta disminución sólo alcanzó niveles significativos en las células transfectadas con 250 ng de siRNAs ( $20 \pm 3$  %  $n = 12$ ) y no en las transfectadas con 500 ng ( $24,6 \pm 4$  %  $n = 6$ ). Serían



#### 4. Resultados.

pues necesarios estudios adicionales con un mayor número de células para obtener una conclusión definitiva respecto al posible efecto de Akt sobre la alteración de este parámetro concreto.



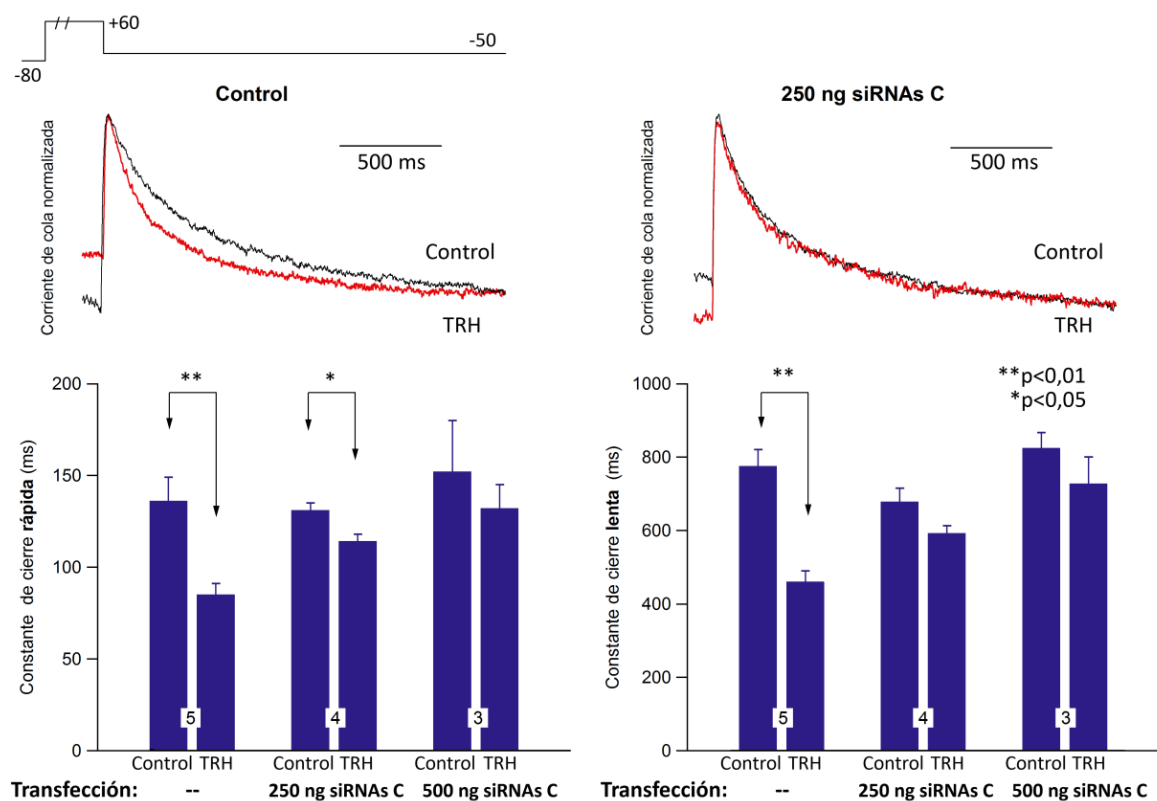
**Figura 25. Efecto de la mezcla de siRNAs C contra hAkt1 sobre el desplazamiento de la I/V de activación y la inhibición de la corriente máxima de cola por TRH en células HEK-H36/T1.** En la parte superior se muestran las curvas corriente-voltaje obtenidas del análisis de familias de corrientes como las mostradas en la Figura 24 antes (círculos negros) y después (círculos blancos) de la adición de 1  $\mu$ M de TRH. Las gráficas corresponden a células control y a las transfectadas 48 h antes con 250 ó 500 ng de siRNAs C contra hAkt1. Los símbolos representan la magnitud de la corriente de cola en el máximo en función del voltaje de despolarización aplicado. Los valores de corriente se presentan normalizados respecto a su valor máximo a voltajes positivos. Las líneas corresponden a las curvas de Boltzmann ( $h(V) = I_{max} [1/(1+e^{-(V-V_{0.5})/k})]$ ) que mejor se ajustan a los datos. En las gráficas se indican mediante flechas los valores de voltaje a los que se alcanza la corriente semimáxima ( $V_{0.5}$ ) y el número de células estudiadas. En la parte inferior se muestran los valores de media  $\pm$  S.E.M. del desplazamiento de la  $V_{0.5}$  (izquierda) y de la reducción del valor máximo de la corriente de cola (derecha) por la TRH. \*  $p < 0,05$  vs. Control.

Por último estudiamos la influencia de los siRNAs sobre la aceleración por la TRH de la desaparición de la corriente de cola, es decir, sobre la velocidad de cierre. Como se aprecia en la

Figura 26, la aceleración por TRH de la caída de la corriente es mucho más notable en las células sin tratar con interferentes que en las transfectadas con éstos. Se puede observar que

las constantes de cierre correspondientes a los componentes rápidos y lentos de desaparición de las corrientes de cola disminuyen un  $36 \pm 4,7 \%$  en las células control tras el tratamiento con la hormona. En células transfectadas con siRNAs para hAkt1 la caída de las corrientes de cola de hERG es muy similar a la de las células control, pero sin embargo casi no es afectada por la adición de TRH, que tan sólo causa una ligera aceleración en las células tratadas con 250 ng y ningún efecto significativo en las tratadas con 500 ng (

Figura 26). Así pues todos estos datos indican en conjunto: i) que el bloqueo de la expresión de Akt disminuye claramente los efectos de la TRH sobre algunos de los parámetros cinéticos de hERG, ii) que la presencia de Akt es necesaria para que el canal hERG mantenga su actividad basal inalterada (ver Zhang *et al.* 2003), y iii) que la quinasa realmente participa en la cascada de regulación por TRH de los canales hERG de las células HEK-H36/T1.



**Figura 26. Efecto de la mezcla de siRNAs contra hAkt en la aceleración de la desaparición de las corrientes de cola inducidas por TRH en células HEK-H36/T1.** En la parte superior se muestran dos ejemplos representativos de las corrientes de cola obtenidas antes (control) y después de la adición de TRH  $1 \mu\text{M}$  (en color rojo) a células no tratadas (izquierda) o tratadas con 250 ng de la mezcla de siRNAs carboxilo contra hAkt (derecha). El protocolo utilizado para la obtención de las corrientes se muestra en la parte superior. Solamente se muestran en las gráficas las corrientes correspondientes al final de la despolarización y las colas obtenidas al repolarizar a  $-50 \text{ mV}$ . Las corrientes han sido normalizadas respecto a su valor máximo y superpuestas para una mejor comparación visual de su tasa de caída. El tratamiento con los interferentes se realizó 48 h antes de las medidas de corriente. En la parte inferior se muestran los análisis del efecto de la TRH sobre la velocidad de desaparición de las corrientes. Se comparan las constantes de cierre del componente rápido (izquierda) y lento (derecha) de caída de las corrientes de cola, obtenidas tras el ajuste biexponencial a las mismas. Las barras

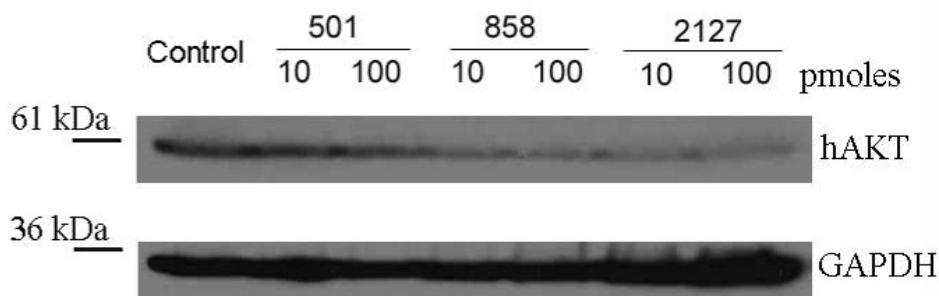
#### 4. Resultados.

corresponden a los valores obtenidos antes (Control) o después de la adición de TRH 1  $\mu$ M. La presencia o ausencia de interferente y el número de células estudiadas se indica en cada caso. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

##### 4.2.1.1.3. Efecto de siRNAs específicos contra hAkt1 sobre la expresión de la quinasa y sobre la respuesta de los canales hERG a TRH en células HEK-H36/T1.

Los datos expuestos previamente nos han permitido demostrar la efectividad en el silenciamiento de hAkt y las alteraciones en la respuesta de hERG a la TRH en presencia de una mezcla de siRNAs contra Akt. Sin embargo, esos tipos de mezclas pueden dar problemas técnicos generando posibles efectos inespecíficos colaterales, al usar como dianas múltiples secuencias de una amplia zona del mRNA. De hecho, no se puede descartar que algún siRNA de los producidos en la reacción del enzima Dicer tenga homología con el mRNA de otro gen, especialmente si se encuentra relacionado con Akt, el cual podría ser responsable o estar implicado en la respuesta fisiológica que atribuiríamos a Akt. Para evitar estos posibles problemas y confirmar inequívocamente la implicación de Akt1 en la trasducción de la señal de la TRH a hERG diseñamos tres siRNAs específicos contra hAkt1 (ver Métodos), que fueron sometidos a un análisis Blast para descartar homologías con otros mRNAs, asegurándonos así de que el efecto es completamente específico. Según su posición en la secuencia del mRNA, los siRNAs se nombraron 501, 858 y 2127.

Para estudiar el efecto de estos siRNAs en el silenciamiento de la proteína hAkt1 transfectamos células HEK-H36/T1 con 10 ó 100 pmoles de los siRNAs contra hAkt1 501, 858 ó 2127, obtuvimos extractos celulares a las 72 h postransfección, y los sometimos a análisis western usando anticuerpos anti-Akt y anti-GAPDH. Aunque el único experimento del que disponemos (Figura 27) presenta algunas deficiencias respecto a la separación de las calles, resulta evidente que los tres siRNAs y especialmente el 2127, provocan una clara reducción de los niveles de proteína hAkt en las células tratadas con ellos.



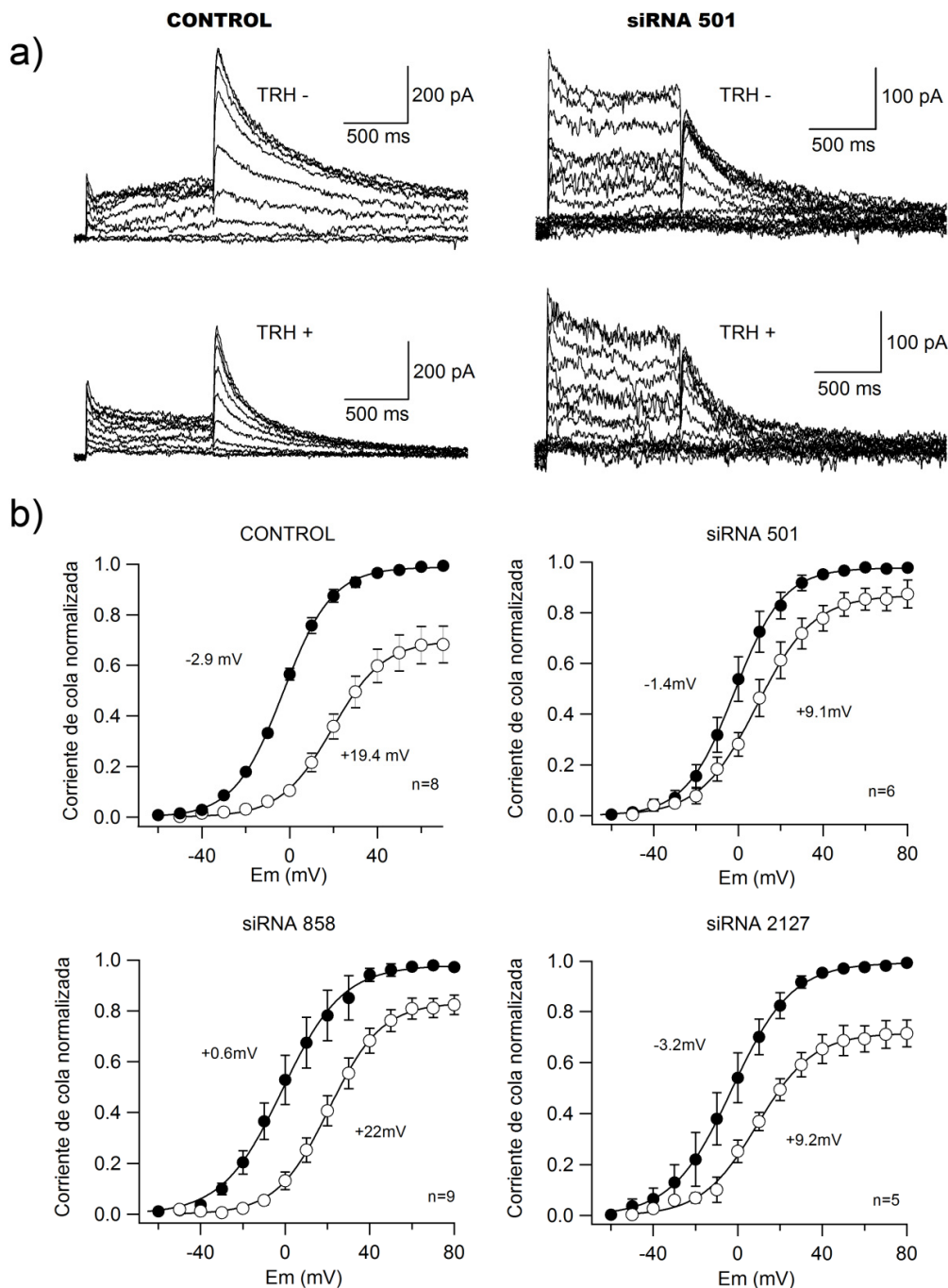
**Figura 27. Análisis western del efecto de los siRNAs específicos contra hAkt1 sobre los niveles de hAkt de células HEK-H36/T1.** La banda correspondiente a 60 KDa corresponde a hAkt, mientras que la de aproximadamente 36 KDa es la de GAPDH, proteína usada como control de carga. Los extractos celulares fueron preparados a partir de triplicados de placas tratadas con 10 ó 100 pmoles del siRNA indicado, y fueron analizados utilizando anticuerpos anti-Akt y anti-GAPDH de Santa Cruz.

Una vez comprobado que los siRNAs específicos son capaces de bloquear la expresión de hAkt, estudiamos si ese silenciamiento también era capaz de bloquear los efectos de la TRH sobre el canal hERG. Para ello realizamos un nuevo estudio electrofisiológico de las células HEK-H36/T1 similar al mostrado en las Figura 25 y

Figura 26 para la mezcla de siRNAs, con 100 pmoles de cada uno de los tres siRNAs 501, 858 y 2127 y 1  $\mu$ g del plásmido pEGFP-C1 como marcador de transfección. A las 48 h estudiamos el efecto de la TRH sobre hERG en células con fluorescencia de GFP. Como se reseñó al usar la mezcla de siRNAs, la densidad de corriente obtenida en las células sin tratar [ $29,2 \pm 2,2$  pA/pF en este conjunto de experimentos ( $n = 3$ ); ver también apartado 4.2.1.1.2.] fue significativamente mayor que la de las células tratadas con el siRNA 501 [ $13,96 \pm 1,8$  pA/pF ( $n = 6$ );  $p < 0,01$ ]. También se observaron menores niveles de corriente en células tratadas con los siRNAs 858 y 2127 [ $21,2 \pm 2,8$  pA/pF ( $n = 8$ ) y  $20,17 \pm 3$  pA/pF ( $n = 4$ ), respectivamente], si bien estas reducciones no alcanzaron significación estadística. En lo que respecta al posible efecto de los interferentes sobre la acción hormonal, su análisis se muestra en la Figura 28. Se puede observar que al añadir la TRH a las células sin tratar con siRNAs tiene lugar la típica disminución de la corriente máxima y la aceleración de la caída de la corriente de cola. Por su parte, en las corrientes correspondientes a una célula tratada con 100 pmoles del siRNA 501, se aprecia que la disminución de la corriente máxima de cola es mucho menor y que no se observa una aceleración de la caída tan marcada como en las células control. En la parte inferior se muestran los análisis de la dependencia de voltaje de activación de las corrientes, en los que resulta patente una disminución del desplazamiento de las curvas I/V a la derecha en las células tratadas con los siRNAs 501 y 2127 respecto al observado en células control. Por su parte, en la Figura 29 se presenta la cuantificación de los efectos de los siRNAs específicos sobre el desplazamiento de la I/V de activación y la inhibición de la corriente máxima de cola causados por la TRH. Podemos ver que el desplazamiento en la dependencia de voltaje que se observa en las células control ( $21,3 \pm 1$  mV,  $n = 8$ ) se encuentra disminuído notablemente en las células tratadas con el siRNA 501 ( $10,4 \pm 1,9$  mV,  $n = 6$ ;  $p < 0,005$ ) y también en las células tratadas con el siRNA 2127 ( $12,41 \pm 3,0$  mV,  $n = 5$ ;  $p < 0,05$ ). Sin embargo, no se observan diferencias claras en los desplazamientos de la I/V por TRH en células tratadas con el siRNA 858 ( $23,3 \pm 3,4$  mV,  $n = 9$ ). En cuanto a la inhibición de la corriente máxima de cola, también podemos observar un efecto claro y estadísticamente significativo en el caso del siRNA 501, con el que tan solo se obtiene un  $11,6 \pm 3,5$  %  $n = 6$  de reducción frente al  $36,2 \pm 4,4$  %  $n = 8$ , ( $p < 0,005$ ) en las células

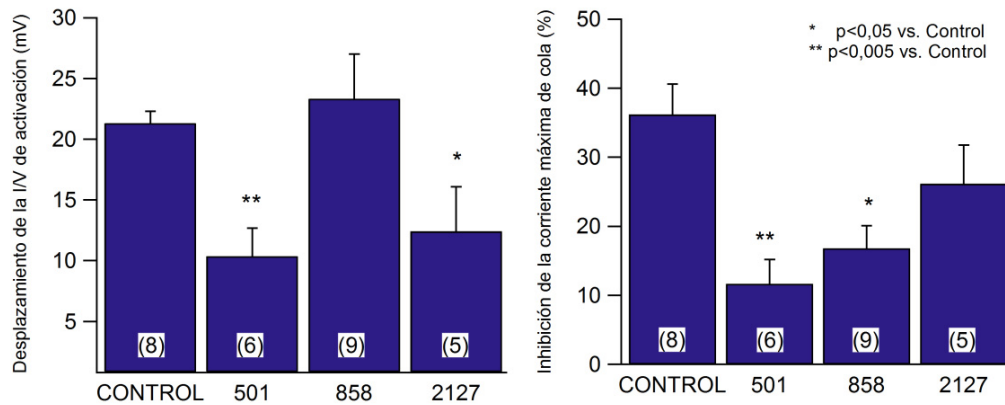
#### 4. Resultados.

control. En el caso del siRNA 858 se alcanza un  $16,8 \pm 3,3 \%$   $n = 9$  ( $p < 0,05$ ) de reducción de la corriente, mientras que con el siRNA 2127 la diferencia observada ( $26,2 \pm 5,6$  mV,  $n = 5$ ) no llega a ser estadísticamente significativa respecto al control. Por tanto podemos concluir que, aún cuando parecen existir algunas diferencias de acción entre los tres utilizados, los siRNAs específicos contra hAkt1 son también capaces de bloquear en buena medida las acciones de la TRH sobre la corriente hERG en células HEK-H36/T1.



**Figura 28. Efecto de los siRNAs específicos contra hAkt1 sobre la regulación por TRH del canal hERG en células HEK-H36/T1.** a), familias de corrientes antes y después de añadir  $1\mu\text{M}$  TRH en células HEK-H36/T1 control (izquierda) y tratadas con 100 pmoles de siRNA 501 (derecha). Las corrientes fueron registradas en respuesta a los protocolos detallados en los apartados 4.1.1.2 y 4.2.1.1.2. b), curvas I/V promedio obtenidas de células no tratadas (control) o tratadas con los interferentes señalados en los distintos paneles. Los siRNAs (100

pmoles) fueron añadidos 48 h antes de los registros. El análisis se realizó en la forma detallada en la leyenda de la Figura 25. Los valores de  $V_{0,5}$  obtenidos de las curvas promedio se indican en la gráfica.

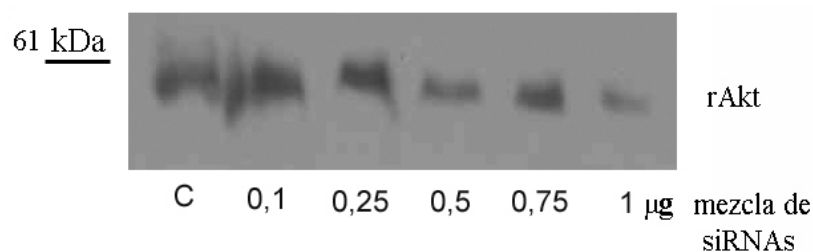


**Figura 29. Cuantificación del efecto de los siRNAs específicos contra hAkt1 sobre las modificaciones de las corrientes hERG inducidas por la TRH en células HEK-H36/T1.** Se muestran las medias  $\pm$  S.E.M. obtenidas del número de células indicado, tanto de los controles como de las células tratadas 48 h antes con 100 pmoles de los siRNAs. Las gráficas corresponden a las modificaciones inducidas por la TRH en la posición de la curva I/V de activación (izquierda) y en la reducción de la corriente máxima de cola (derecha), de acuerdo a los datos mostrados en la Figura 28.

#### 4.2.1.2. Estudio de la posible implicación de Akt/PKB en la ruta de señalización desde el receptor de TRH hasta los canales rERG en células GH<sub>3</sub>.

##### 4.2.1.2.1. Efectos de la mezcla de siRNAs contra Akt1 de rata en los niveles de expresión de la quinasa y la modulación de rERG por TRH en células GH<sub>3</sub>.

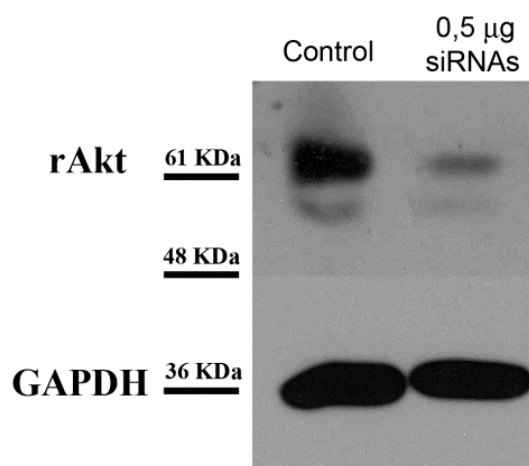
Para silenciar la expresión de la proteína rAkt en la línea celular GH<sub>3</sub> de rata preparamos una única mezcla de siRNAs a partir del mRNA de rAkt1. En primer lugar estudiamos el efecto de la cantidad de siRNAs sobre el silenciamiento de la proteína rAkt. Para ello transfectamos células GH<sub>3</sub> con cantidades crecientes de la mezcla de siRNAs contra rAkt y a las 48 h de la transfección obtuvimos los extractos celulares y analizamos el nivel de rAKT por western (Figura 30).



**Figura 30. Efecto de las diferentes cantidades de la mezcla de siRNAs contra rAkt1 transfectadas a células GH<sub>3</sub>.** Se muestra un ensayo Western, tanto de células control no tratadas como de células tratadas con cantidades crecientes de la mezcla de siRNAs. En todas las calles se han cargado 100  $\mu$ g de proteína de extracto celular, obtenido de placas transfectadas por triplicado. El anticuerpo empleado fue el anti-Akt sc-8312.

#### 4. Resultados.

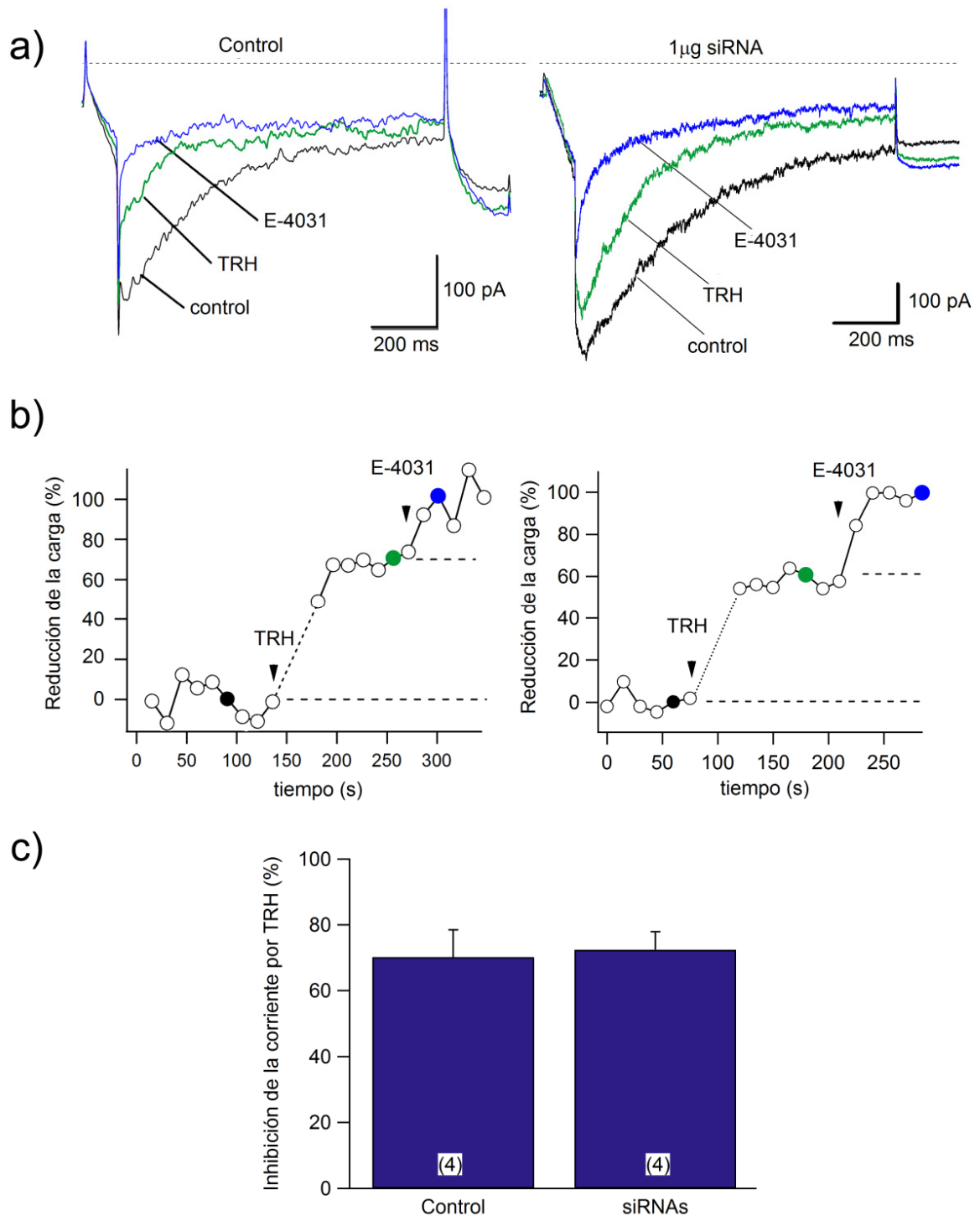
El resultado del análisis western indica claramente que la mezcla de siRNAs es capaz de disminuir la cantidad de proteína rAkt en las células GH<sub>3</sub>, aunque la definición electroforética de este experimento es deficiente, y no se observa en todos los casos una correlación clara entre la cantidad de siRNAs y efecto silenciador. Por otra parte, se sabe que las células GH<sub>3</sub> tienen una tasa de transfección muy baja, lo cual puede hacer que infravaloremos los niveles de silenciamiento al medirlos en todo el conjunto celular. Por ello decidimos hacer un análisis western, pero utilizando solo células con mayor probabilidad de haber sido transfectadas efectivamente con siRNAs. Para ello transfectamos células GH<sub>3</sub> con 0,5 µg de la mezcla de siRNAs contra rAkt y con 0,5 µg de pEGFP-C1 como marcador de transfección, y 48 h después de la transfección las células se recogieron y se separaron mediante un separador celular Facstar plus (Becton Dickinson), en el que cuando las células se hacen pasan por un flujo laminar, incide sobre ellas un láser y se recoge la fluorescencia emitida por cada célula, pudiendo identificar y separar las células fluorescentes de las no fluorescentes. Con las cuantificaciones obtenidas con el separador celular pudimos confirmar la baja transfectabilidad de las células GH<sub>3</sub>, que es del  $6,6 \pm 2,4 \%$  (n = 4) en nuestras condiciones. Debido a ello, tuvimos que repetir la transfección y separación varias veces hasta obtener al menos medio millón de células transfectadas para cada condición experimental, con las cuales preparamos los extractos celulares y analizamos los niveles de rAkt (Figura 31).



**Figura 31. Efecto de la mezcla de siRNAs contra rAkt1 en células GH<sub>3</sub> seleccionadas con el marcador eGFP.** Las células fueron transfectadas con 0,5 µg del plásmido pEGFP-C1 como marcador de transfección y con o sin 0,5 µg de la mezcla de siRNAs. 48 h después de la transfección fueron seleccionadas gracias a su fluorescencia de eGFP. Solo las células positivas para la fluorescencia de eGFP se utilizaron para realizar los extractos celulares y el posterior análisis western blot (100 µg por calle). Se pueden ver las bandas correspondientes a la detección con el anticuerpo anti-Akt sc-8312 y al anti GAPDH sc-32233.

Como era de esperar, al utilizar células seleccionadas positivas para eGFP y que por tanto han sido transfectadas, se puede apreciar claramente que la transfección con 0,5 µg por

placa de la mezcla de siRNAs es realmente efectiva para producir un notable silenciamiento de la expresión de proteína rAkt, netamente superior al observado en la Figura 30 con la población total de células usadas para la transfección.



**Figura 32. Efecto de la mezcla de siRNAs contra rAkt1 en la respuesta de rERG a la TRH en células GH<sub>3</sub>.** a) se muestran las corrientes en ausencia de TRH o tras la adición de TRH 1 µM y de E-4031 5 µM. A la izquierda aparecen los datos obtenidos con una célula control y a la derecha los correspondientes a otra tratada con 1 µg de la mezcla de siRNAs. Las medidas fueron realizadas 48 h después de la transfección y utilizando el protocolo detallado en el apartado 4.1.1.2. b) curso temporal de las variaciones de las corrientes iónicas sensibles a E-4031 (rERG) en las mismas células. Los registros de corriente en el panel a) corresponden a los momentos indicados con puntos coloreados. Los datos corresponden al total de carga medida entre el comienzo y el final de la hiperpolarización a -



#### 4. Resultados.

100mV. c) Valores medios  $\pm$  S.E.M. de la inhibición de las corrientes rERG por TRH en células control y en las transfectadas con 1  $\mu$ g de la mezcla de siRNAs contra rAkt1.

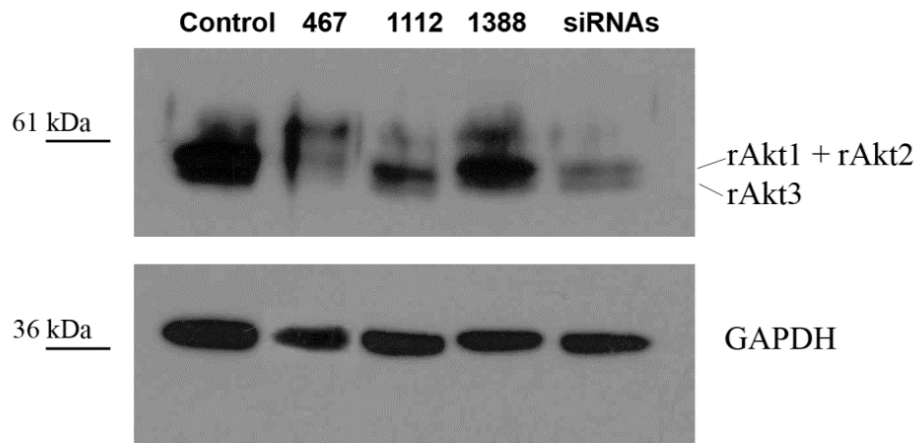
Tras haber comprobado la efectividad de la mezcla de siRNAs contra rAkt a nivel de proteína pasamos a estudiar el efecto de este silenciamiento sobre la regulación por TRH de las corrientes rERG endógenas de las células GH<sub>3</sub>. Para ello se transfectaron las células con 1  $\mu$ g del plásmido pEGFP-C1 y con 1  $\mu$ g de la mezcla de siRNAs y se realizaron medidas electrofisiológicas mediante *patch clamp* en la modalidad de parche perforado, utilizando solo células que expresaran GFP para asegurarnos de que en ellas se había producido transfección del plásmido, y por ello con toda probabilidad también de los siRNAs. Los resultados obtenidos se muestran en la

Figura 32. Se puede observar que la inhibición provocada por la TRH en las células control (70,2  $\pm$  9,2 % n = 4) es totalmente análoga a la provocada en las células tratadas con siRNAs (72,5  $\pm$  5,5 %, n = 4). Estos datos demuestran que el tratamiento con la mezcla de siRNAs contra rAkt1 no afecta a la inhibición del canal rERG por la TRH en las células GH<sub>3</sub>, indicando que en estas células la proteína rAkt no interviene en la cascada de señalización desde el receptor de TRH al citado canal.

#### **4.2.1.2.2. Estudio del efecto silenciador de los siRNAs específicos contra rAkt1 y de su acción sobre la regulación del canal rERG por TRH en células GH<sub>3</sub>.**

Tras observar que la mezcla de siRNAs contra rAkt1 no afectaba a la regulación de *erg* por TRH en células GH<sub>3</sub>, diseñamos los siRNAs específicos contra rAkt1 467, 1112 y 1388 (ver Métodos), y estudiamos su capacidad de silenciamiento génico sobre las isoformas de la proteína quinasa Akt de rata. De nuevo, para estudiar este efecto en células GH<sub>3</sub>, seleccionamos las células eficientemente transfectadas con el plásmido pEGFPC1 que expresaban el marcador de transfección fluorescente. Como explicamos previamente, esas células tienen una mayor probabilidad de haber sido transfectadas también por siRNAs. Para ello transfectamos células GH<sub>3</sub> con 1  $\mu$ g del plásmido pEGFPC1 y 100 pmoles de cada uno de los tres siRNAs específicos, o bien 1  $\mu$ g de la mezcla de siRNAs contra rAkt como control de silenciamiento, y repetimos la recogida de células fluorescentes hasta obtener un número suficiente.

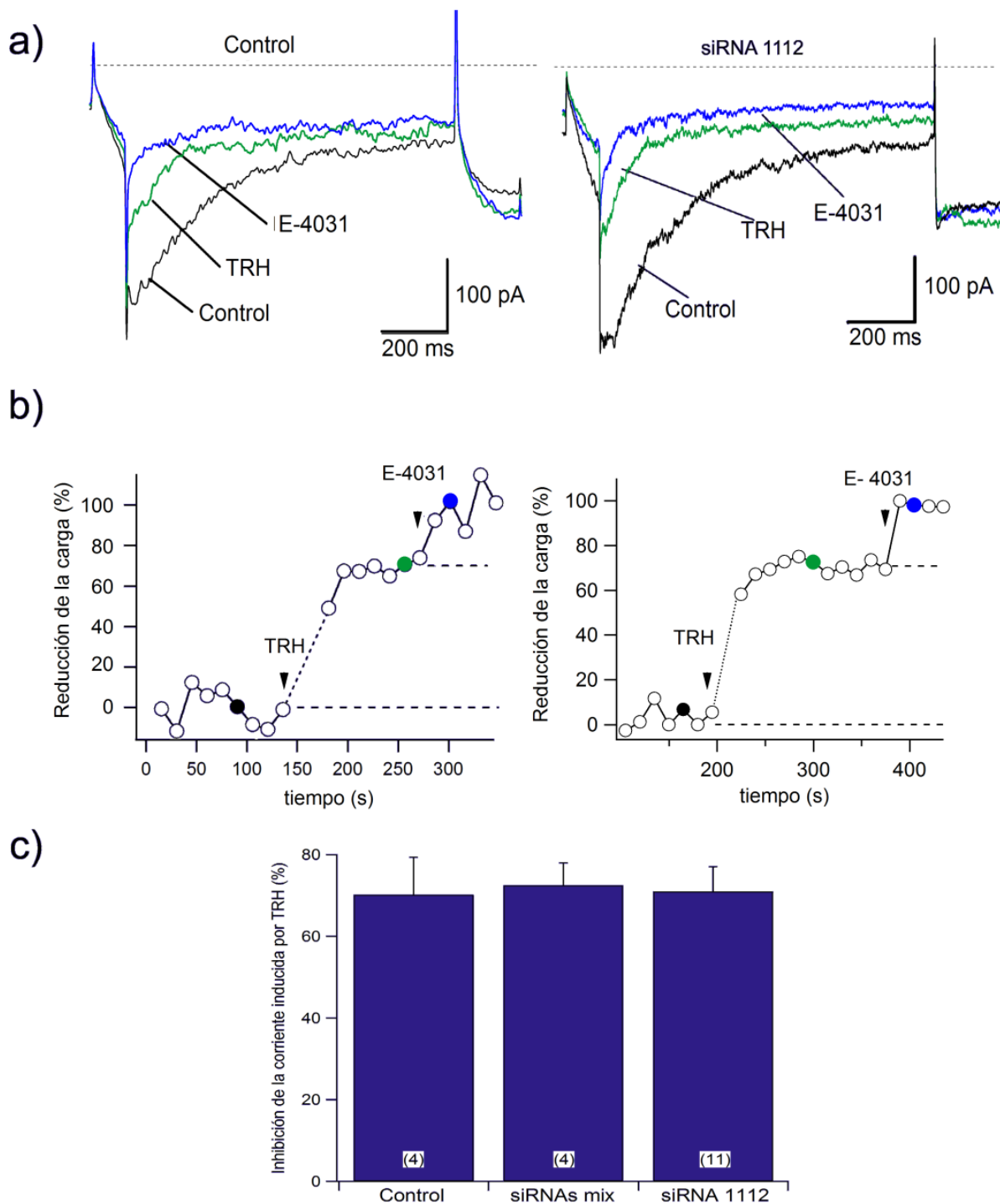
Aunque la figura no es muy limpia, el análisis western realizado con extractos de estas células GH<sub>3</sub> seleccionadas (Figura 33) reveló un notable nivel de silenciamiento de Akt a nivel de proteína, especialmente con los siRNAs 467 y 1112, así como con la mezcla de siRNAs.



**Figura 33. Análisis Western del efecto de los siRNAs específicos contra rAkt1 sobre los niveles proteicos de la quinasa en células GH<sub>3</sub>.** Células GH<sub>3</sub> co-transfectadas con 1 µg de pEGFP-C1 y con 100 pmoles del siRNA específico indicado contra rAkt1 o con 1 µg de la mezcla de siRNAs contra rAkt. Las células fueron seleccionadas 48 después de la transfección en función de su fluorescencia, utilizándose para el análisis aquellas que presentaban fluorescencia de la eGFP utilizada como control de transfección. De izquierda a derecha: control y células tratadas o con 100 pmoles de siRNA 467, 1112 y 1388, o con 1 µg de la mezcla de siRNAs contra rAkt. La imagen superior corresponde a las isoformas de rAkt localizadas en torno a 60 kDa y el panel inferior al GAPDH, usado como control de carga.

Una vez estudiado el efecto silenciador sobre Akt de los siRNAs específicos en células GH<sub>3</sub>, analizamos si este silenciamiento alteraba la respuesta de los canales rERG a la TRH. Ya que utilizando mezclas de múltiples siRNAs contra rAkt1 habíamos visto que el silenciamiento no afectaba a esa respuesta, realizamos de nuevo medidas electrofisiológicas en células GH<sub>3</sub> transfectadas con 100 pmoles del siRNA específico 1112. Para identificar las células transfectadas, junto con el siRNA se cotransfectaron 0,5 µg del plásmido pEGFP-C1, y sólo las células que presentaban fluorescencia de eGFP fueron utilizadas en los registros. Las medidas se realizaron utilizando la técnica de *patch clamp* con la variante de parche perforado como se ha descrito anteriormente. Al analizar las medidas electrofisiológicas (Figura 34), observamos que la adición de 1 µM de TRH a células transfectadas con siRNA 1112 producía una inhibición de la corriente de un  $71 \pm 6 \%$  ( $n = 11$ ), un nivel de inhibición totalmente análogo al observado en células control. Estos datos apoyan de nuevo la conclusión de que en las células GH<sub>3</sub> la proteína quinasa Akt no está implicada en la ruta de transducción de señales desde los receptores de TRH hasta los canales rERG.

#### 4. Resultados.

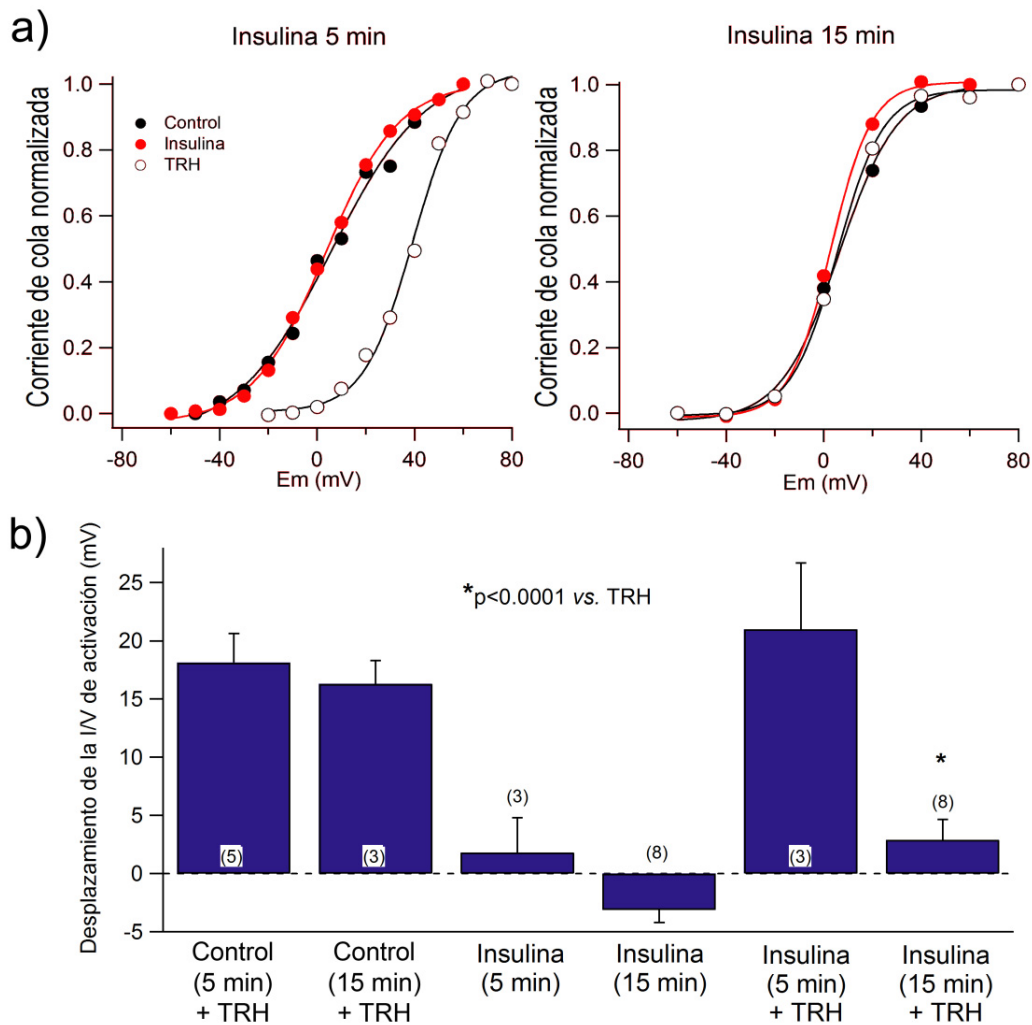


**Figura 34. Efecto del siRNA 1112 contra rAkt1 en la respuesta de rERG a la TRH en células GH<sub>3</sub>.** a) Trazos representativos de corrientes en ausencia de TRH o tras la adición de TRH 1  $\mu$ M y de E-4031 5  $\mu$ M correspondientes a una célula control y a otra tratada con 100 pmoles de siRNA 1112. Los registros fueron realizados 48 h después de la transfección en los momentos indicados mediante puntos negros en b) y utilizando el protocolo detallado en el apartado 4.1.1.2. b) Curso temporal de las variaciones de las corrientes iónicas en las mismas células. Los datos corresponden al total de carga obtenida entre el comienzo y el final de la hiperpolarización a -100 mV. c) Valores de inhibición de la corriente rERG inducida por TRH en células control o tratadas con 1  $\mu$ g de mezcla de siRNAs ó 100 pmoles del siRNA 1112 contra rAkt1. Se indica el porcentaje de inhibición medio más S.E.M. y el número de células usadas en cada caso.

#### 4.2.1.3. Efecto de la insulina en la respuesta de *erg* a la TRH.

Como una última indicación de la posible participación de Akt en la respuesta de *erg* a la TRH y de las posibles diferencias en las células HEK-H36/T1 y GH<sub>3</sub>, estudiamos el efecto de la insulina, un conocido y bien estudiado activador de la cascada de PI3K-Akt en múltiples líneas celulares (Brazil y Hemmings 2001, Hirsch *et al.* 2007, Franke 2008). Dado que las células HEK293 poseen tanto receptor de insulina como de IGF-1 (Beitner-Johnson *et al.* 1995, Lavan *et al.* 1997) y para asegurar la completa activación de Akt, utilizamos una alta concentración de insulina (1  $\mu$ M) capaz de activar ambos tipos de receptores. Como se aprecia en la Figura 35, el desplazamiento en la dependencia de voltaje de activación de hERG inducido por la TRH en células HEK-H36/T1 es el mismo cuando la adición de la hormona es realizada tras 5 ó 15 min de registro de corriente. La utilización de la variante parche perforado y la prácticamente nula alteración de la composición del medio intracelular que conlleva, permite mantener el ambiente celular estable necesario para la realización de estos experimentos a largo plazo. En estas condiciones, el tratamiento de las células con insulina 1  $\mu$ M durante 5 ó 15 min, no modifica significativamente *per se* la dependencia de voltaje de activación. Sin embargo, si tras el tratamiento con insulina se añade TRH 1  $\mu$ M a las mismas células, se observan claras diferencias en la respuesta en función de la duración del tratamiento con insulina. Así, mientras un tratamiento de 5 min con insulina no altera la dependencia de voltaje de activación inducida por una adición ulterior de 1  $\mu$ M de TRH ( $18,13 \pm 2,5$  mV de desplazamiento de la I/V en células no tratadas con insulina vs.  $21 \pm 5,7$  mV en células tratadas), tras 15 min de tratamiento con insulina el efecto de la TRH sobre el desplazamiento de la I/V se reduce a tan solo  $2,9 \pm 1,7$  mV. Estos datos indican por una parte que la mera activación de Akt por la insulina no parece suficiente para modificar el comportamiento cinético de hERG. Por otra parte, estos resultados sugieren que tras largos tratamientos con insulina, la disponibilidad de Akt por la TRH resulta reducida, impidiendo así su uso por la hormona en la cascada de transducción desde su receptor hasta hERG y, por tanto, la alteración del comportamiento cinético del canal en las células HEK-H36/T1. En conjunto, estos datos están en sintonía con los obtenidos con siRNAs demostrando la implicación de Akt en la cascada de transducción en estas células.

#### 4. Resultados.

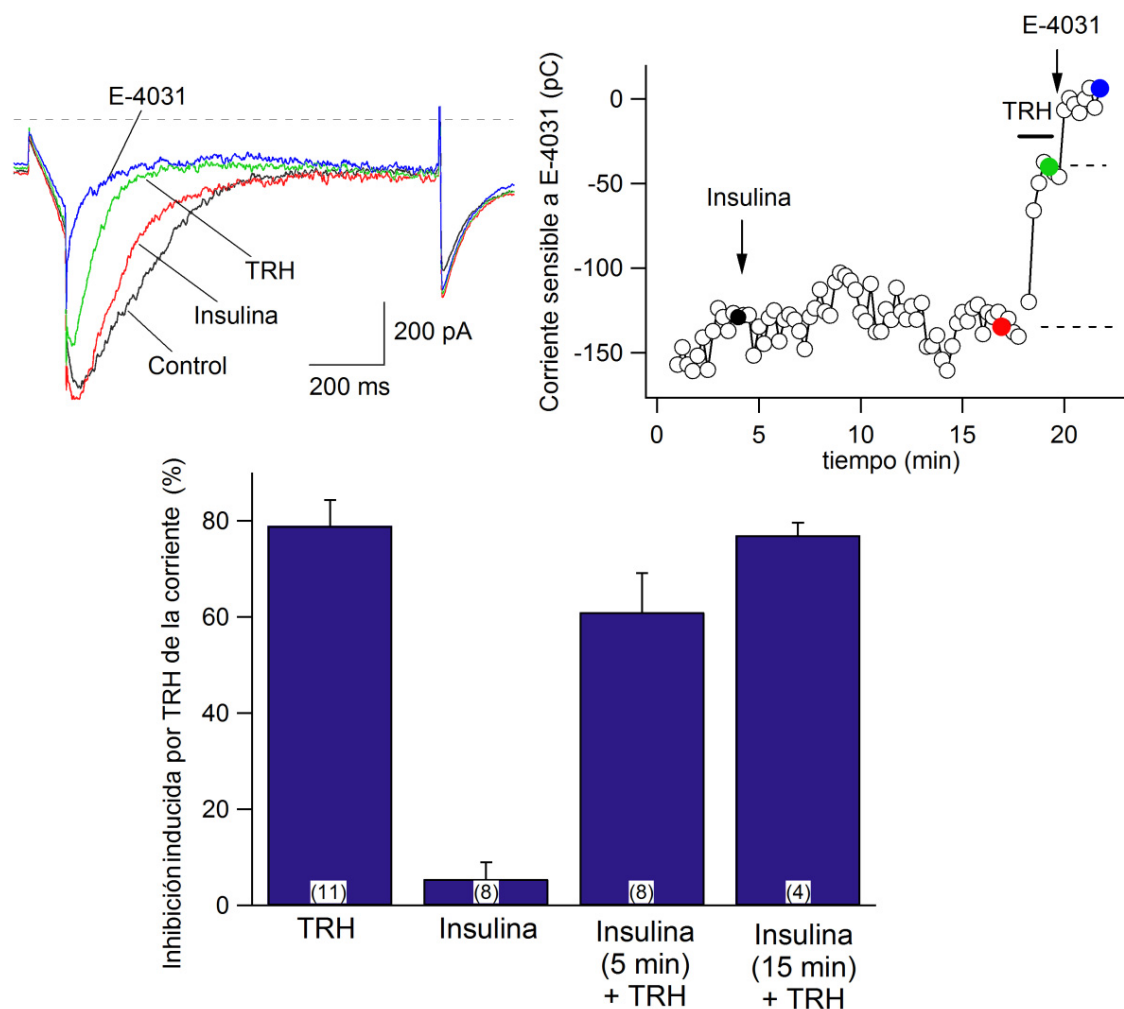


**Figura 35. Efecto de la insulina sobre la respuesta a TRH de los canales *erg* en células HEK-H36/T1.** a) Curvas corriente-voltaje obtenidas al principio del experimento (círculos negros), después del tratamiento con 1  $\mu$ M de insulina (círculos rojos) y tras la adición posterior de 1  $\mu$ M de TRH (círculos blancos). Las gráficas corresponden a células tratadas 5 (izquierda) ó 15 min (derecha) con insulina 1  $\mu$ M antes de la adición de TRH 1  $\mu$ M. Los símbolos representan la magnitud de la corriente de cola en el máximo en función del voltaje de despolarización aplicado. Los valores de corriente se presentan normalizados respecto a su valor máximo a voltajes positivos. Las líneas corresponden a las curvas de Boltzmann ( $h(V) = I_{max} [1/(1+e^{(V-V_{1/2})/k})]$ ) que mejor se ajustan a los datos. b) Cuantificación de los efectos de la insulina y la TRH en el desplazamiento de la dependencia de voltaje de activación. Las dos primeras barras corresponden a células control tratadas con TRH 1  $\mu$ M tras 5 ó 15 min de incubación en medio salino extracelular. Las dos barras centrales muestran el efecto de la incubación durante 5 ó 15 min con insulina 1  $\mu$ M sobre la dependencia de voltaje de hERG y finalmente las dos barras de la derecha muestran los efectos de la adición de TRH 1  $\mu$ M a células incubadas previamente en presencia de insulina durante 5 ó 15 min. Nótese que los valores de desplazamiento en presencia de TRH más insulina se refieren al desplazamiento hacia la derecha de las curvas respecto a las obtenidas en presencia de insulina sola.

A continuación, estudiamos asimismo si el tratamiento previo con insulina, con la consecuente activación de Akt, afectaba a la respuesta de rERG a la TRH en células GH<sub>3</sub>, en las que el silenciamiento de Akt no la alteraba. Para ello, de nuevo realizamos tratamientos con insulina 1  $\mu$ M tanto de 5 como de 15 min y estudiamos el efecto de la adición posterior de TRH 1  $\mu$ M. Como se aprecia en la

Figura 36, el tratamiento solo con insulina no modificó prácticamente los niveles de la corriente rERG, ni siquiera tras 15 min de exposición. En este sentido, es conveniente mencionar que ha sido descrito que un tratamiento de tan solo 5 min en condiciones similares es suficiente para causar una máxima activación de Akt en estas células (Hayakawa *et al.* 2002). Por otra parte, la adición posterior de TRH causó una inhibición de la corriente de  $K^+$  sensible a E-4031 (rERG) del  $78,9 \pm 5,4 \%$  ( $n = 11$ ) en células control, mientras que en células tratadas previamente con insulina durante 5 min fue del  $61,0 \pm 8,1 \%$  ( $n = 8$ ) y del  $77,0 \pm 2,6 \%$  ( $n = 4$ ) tras 15 min de tratamiento (

Figura 36). Estos datos, también en sintonía con los obtenidos con los siRNAs en células GH<sub>3</sub>, indican que efectivamente en estas células, a diferencia de lo observado con las HEK-H36/T1, Akt no parece contribuir a los efectos de la TRH sobre los canales *erg*.



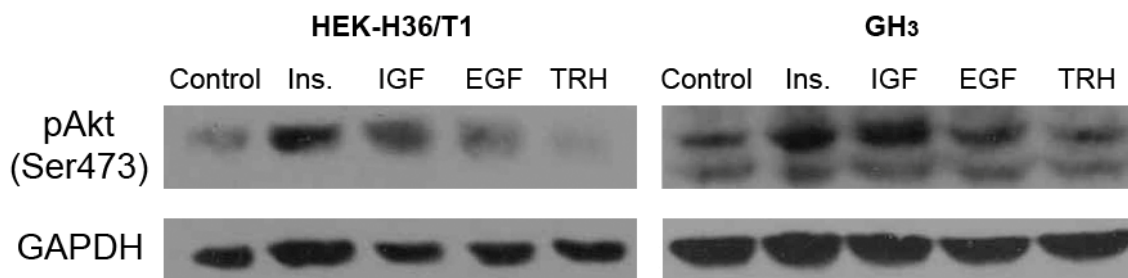
**Figura 36. Efecto de la insulina sobre la respuesta a TRH de los canales *erg* en células GH<sub>3</sub>.** En la parte superior izquierda se muestran se muestran trazos de corriente antes y después de la adición sucesiva de insulina 1  $\mu$ M, TRH 1  $\mu$ M y E-4031 5  $\mu$ M en una célula GH<sub>3</sub> representativa. Los registros de corriente fueron obtenidos utilizando el protocolo detallado en el apartado 4.1.1.2 y corresponden a los momentos indicados con puntos coloreados en el panel de la derecha, que muestra el curso temporal de las variaciones de las corrientes iónicas en la misma célula. El panel inferior muestra la cuantificación del efecto hormonal sobre las corrientes rERG tras restar las remanentes en presencia de E-4031. Los datos corresponden a los efectos de inhibición de corriente en células

#### 4. Resultados.

tratadas con TRH, insulina o ambos, según se indica en los pies de las barras. El número de células promediadas se indica entre paréntesis.

##### 4.2.1.4. Fosforilación/activación de Akt por TRH.

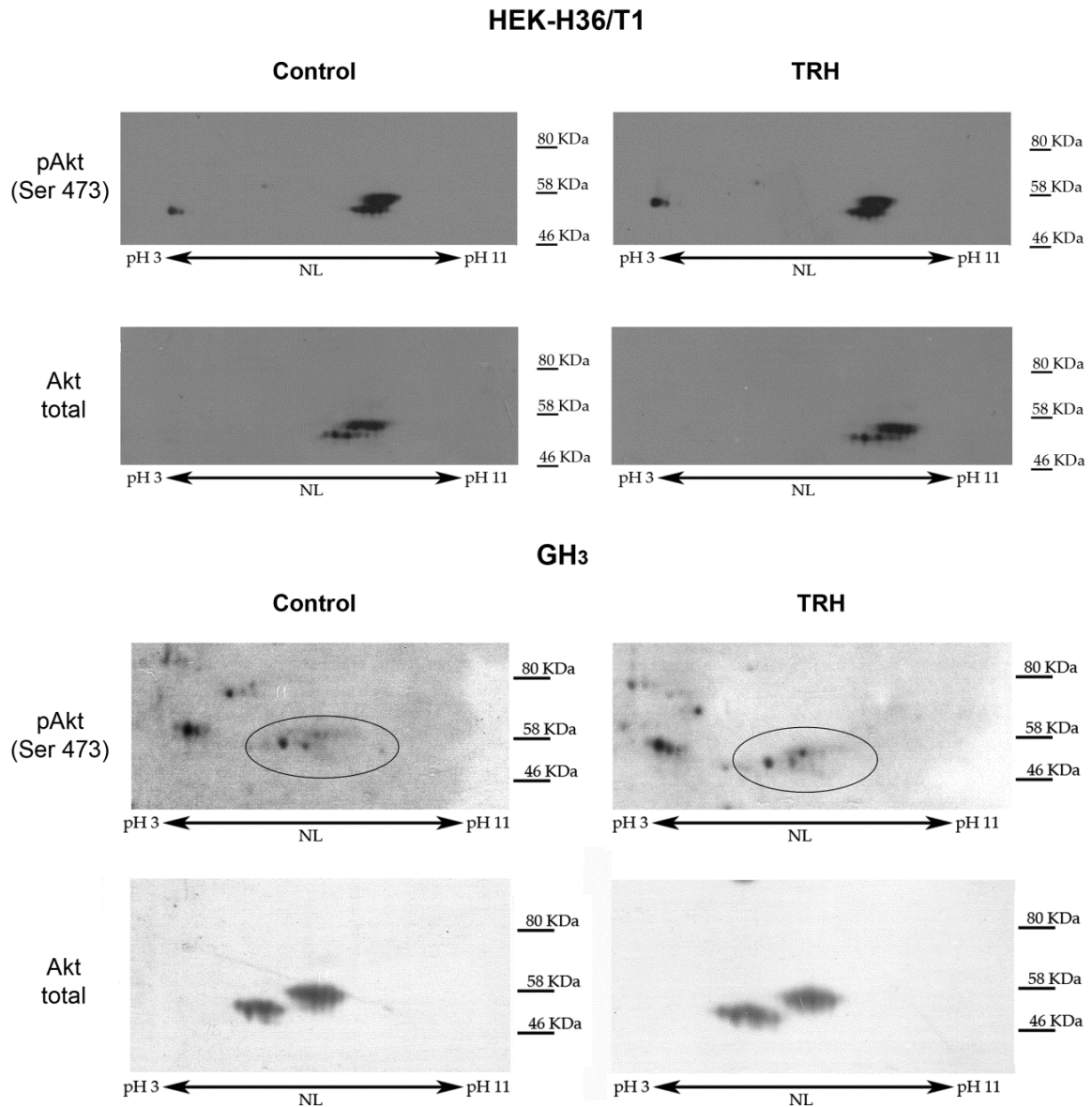
Los datos presentados hasta el momento indican que en células HEK-H36/T1 la proteína quinasa Akt está implicada en la transducción de la señal de la TRH hasta los canales *erg*, pero que en las células GH<sub>3</sub> no es así. Para profundizar en las posibles causas de esa diferencia estudiamos la propia activación de Akt por la TRH en ambos tipos celulares. Para ello analizamos el estado de fosforilación de Akt y si éste variaba tras la adición de TRH mediante inmunodetección con un anticuerpo específico para la forma de Akt fosforilada en la serina 473, un residuo fundamental en su activación (Song *et al.* 2005). Además de tratar las células con TRH, también se trataron con insulina, IGF y EGF como controles, dado que había sido descrito que el tratamiento con estas hormonas produce la fosforilación de Akt tanto en células GH<sub>3</sub> como en HEK293. Para apreciar mejor el efecto del tratamiento, las células fueron cultivadas en medio sin suero durante las dos horas y media previas al experimento, condiciones similares a las que suelen sufrir durante los experimentos electrofisiológicos.



**Figura 37. Fosforilación de Akt en respuesta a diferentes hormonas.** Se muestran análisis western de células HEK-H36/T1 y GH<sub>3</sub> control y tratadas 10 min con: insulina (Ins.) 4  $\mu$ M, IGF 40 nM, EGF 20 nM ó TRH 1  $\mu$ M. Los paneles superiores corresponden a la detección con anticuerpo anti fosfo-Akt Ser473 y los paneles inferiores a las mismas muestras detectadas con anticuerpo anti-GAPDH que se utilizó como control de carga.

Como se puede ver en la Figura 37, tanto en las células HEK-H36/T1 como en las GH<sub>3</sub> la proteína quinasa Akt resulta notablemente fosforilada tras 10 min de tratamiento con insulina o IGF y en menor medida con EGF. Sin embargo, en ninguno de los dos tipos celulares estudiados se observa un aumento en la fosforilación de Akt como respuesta al tratamiento con TRH. De hecho, en ambos casos incluso parece que Akt se encuentre, tras el tratamiento con TRH, con un nivel de fosforilación menor que en las condiciones basales. Para estudiar mejor esta posibilidad optamos por realizar un análisis western de fosfo-Akt tras separación por electroforesis bidimensional que permite analizar las distintas isoformas de Akt y sus cambios en fosforilación tanto por

intensidad como por movilidad electroforética, ya que la fosforilación produce una disminución en el punto isoeléctrico de la proteína. Además las membranas de inmunodetección fueron sometidas sucesivamente al anticuerpo anti-fosfo-Akt y al anti-Akt total como análisis de referencia.



**Figura 38. Análisis western tras electroforesis bidimensional del efecto de TRH sobre el estado de fosforilación de Akt en células HEK-H36/T1 y GH<sub>3</sub>.** Las muestras corresponden a células HEK-H36/T1 (arriba) y GH<sub>3</sub> (abajo) control y tratadas 10 min con TRH 1  $\mu$ M. En cada tipo celular los paneles superiores corresponden a la detección con anticuerpo anti-fosfo-Akt Ser473 y los paneles inferiores a las mismas muestras detectadas con anticuerpo anti-Akt total. Se indica en cada caso el rango de pH (no lineal) utilizado para la primera dimensión de la electroforesis.

Como se puede apreciar en la Figura 38 para ambos tipos celulares, tanto los *spots* de detección de Akt fosforilada en la Ser473 como los correspondientes a la proteína Akt total, permanecen inalterados tras un tratamiento con TRH y no cambia el perfil electroforético de la



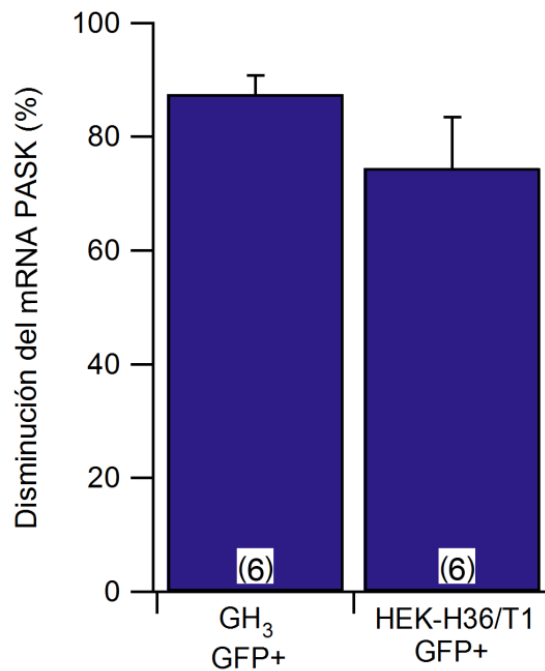
#### 4. Resultados.

proteína ni en células HEK-H36/T1 ni en GH<sub>3</sub>. Por tanto parece evidente que la TRH no causa aumentos ni disminuciones en la fosforilación de Akt ni en las células HEK-H36/T1 ni en las células GH<sub>3</sub>. Mientras que este resultado se ajusta a lo que hemos descrito para células GH<sub>3</sub>, resulta claramente sorprendente respecto a la demostrada implicación de Akt en el efecto de la TRH en células HEK-H36/T1.

#### 4.2.2. Estudio de la posible participación de la quinasa PASK en la ruta de señalización desde el receptor de TRH hasta los canales *erg*.

Una de las quinasas de las que sospechamos que podría estar implicada en la ruta de transducción de señales desde el receptor de TRH a los canales *erg* es la proteína quinasa PASK (*PAS domain-containing serine/threonine protein kinase*). Nos pareció particularmente interesante dado que, como su nombre indica, contiene un dominio PAS análogo al que está presente en la región inicial de los canales *erg*, que en varios casos ha sido implicado en interacciones proteína-proteína y que en el caso de hERG parece participar en la normal funcionalidad del canal (Schläfli *et al.* 2009, Morais-Cabral *et al.* 1998). Además, hay datos que indican que hERG podría ser fosforilado por PASK (Schläfli *et al.* 2011). Por ello nos planteamos estudiar el efecto que el silenciamiento de la expresión de la proteína PASK podría tener sobre la respuesta a TRH de los canales *erg* tanto en células GH<sub>3</sub> como en HEK-H36/T1, mediante la síntesis de mezclas de siRNAs dirigidas contra la secuencia de PASK de rata o humana respectivamente (ver Métodos).

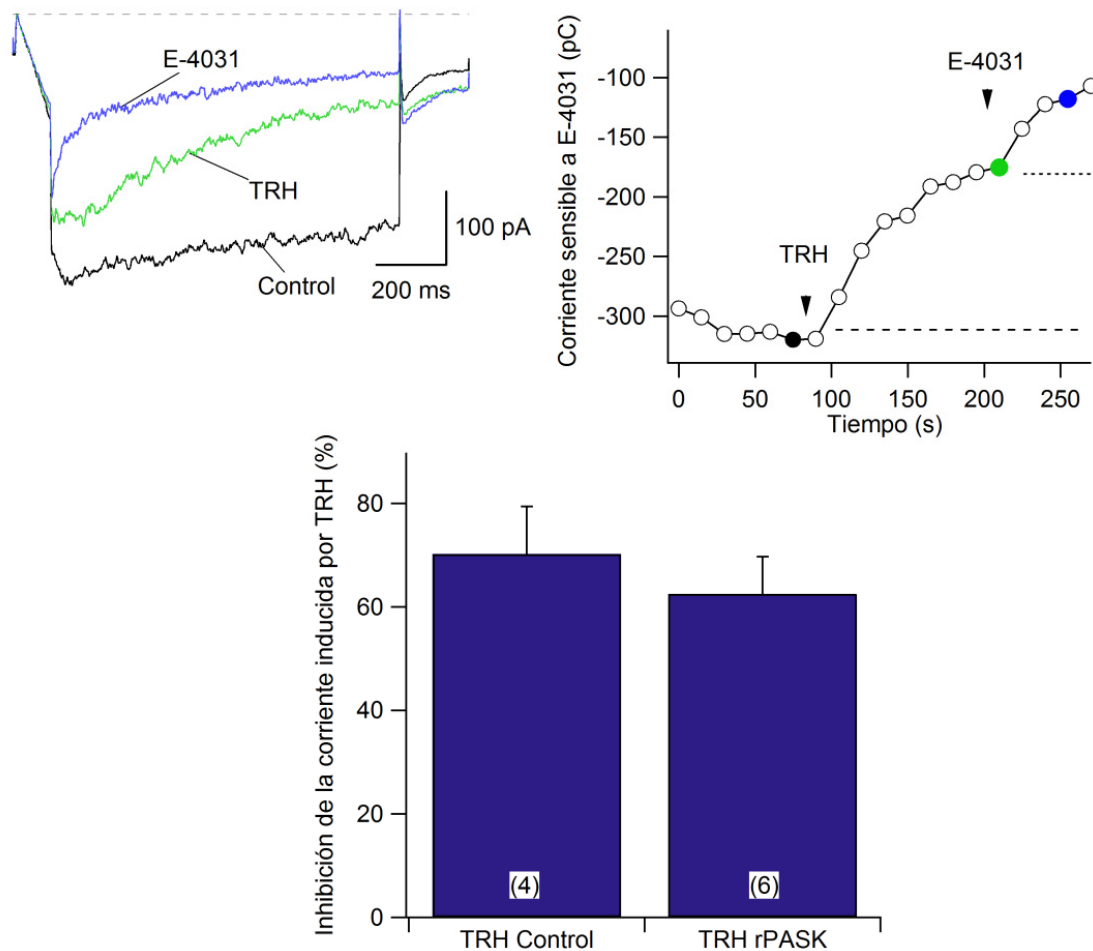
Como no disponíamos de anticuerpos comerciales para PASK, en primer lugar estudiamos la efectividad del silenciamiento en ambos tipos celulares midiendo los niveles de mRNA mediante PCR cuantitativa. Así, se transfectaron ambos tipos celulares con 0,5 µg de la mezcla de siRNAs correspondiente y se usó como marcador de transfección 1 µg del plásmido pEGFP-C1. Las células transfectadas fueron separadas a las 48 h mediante un FAQstar *cell sorter*, según la expresión en ellas o no del marcador de transfección. De cada muestra de células positivas para eGFP se obtuvo el RNA total y se realizó la PCR cuantitativa (Figura 39). En ella se puede ver que la transfección de las mezclas de siRNAs anti PASK reduce en gran medida los niveles de mRNA de las células tratadas, indicando por lo tanto un silenciamiento efectivo de la expresión génica.



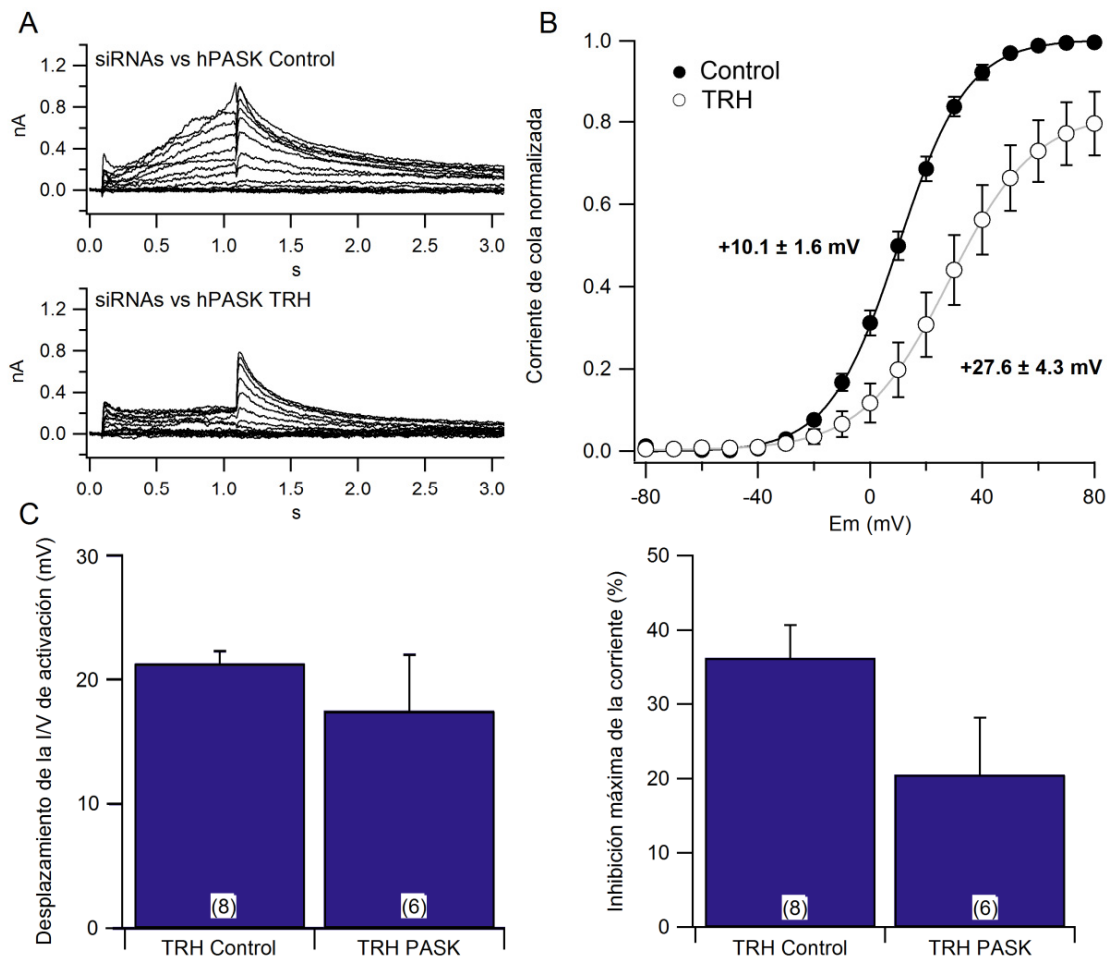
**Figura 39. Comprobación del silenciamiento de PASK a nivel de mRNA medido mediante PCR cuantitativa.** Se muestra la disminución en los niveles de mRNA de PASK en células de rata GH<sub>3</sub> y en células humanas HEK-H36/T1. Cada uno de los dos experimentos se llevó a cabo por triplicado y se calculó la media de las tres mediciones. En cada barra se indica la media de los dos experimentos más el S.E.M.

Tras comprobar la efectividad silenciadora de las mezclas de siRNAs anti PASK, pasamos a estudiar si la transfección con ellas producía algún efecto en la respuesta de los canales *erg* a la TRH. Como siempre, para las medidas electrofisiológicas usamos tan sólo las células que expresan fluorescencia de eGFP. Como se muestra en la Figura 40, en células GH<sub>3</sub> transfectadas con la mezcla de siRNAs contra rPASK el efecto inhibitor de la TRH sobre las corrientes rERG alcanzó  $62,5 \pm 7,2$  % ( $n = 4$ ) un valor que no es significativamente diferente del observado en las células control ( $70,2 \pm 9,2$  %,  $n = 4$ ). En cuanto a las células HEK-H36/T1 transfectadas con siRNAs anti hPASK, se analizaron los efectos de la TRH sobre la dependencia de voltaje y la inhibición de la corriente de cola de hERG, como se muestra en la Figura 41. Se puede observar que en las células con PASK silenciada, la TRH produce un desplazamiento de la dependencia de voltaje en de  $17,5 \pm 4,5$  mV ( $n = 6$ ) y una inhibición de la corriente de un  $20,5 \pm 7,7$  % ( $n = 6$ ), valores que tampoco fueron diferentes de los observados en las células control. Por tanto, la quinasa PASK no parece desarrollar un papel relevante en la transducción de la señal de la TRH hasta los canales *erg*.

#### 4. Resultados.



**Figura 40. Efecto del silenciamiento de rPASK en la regulación hormonal de rERG por TRH en células GH<sub>3</sub>.** En el panel superior derecho se muestra la variación en la cantidad de corriente rERG con el tiempo. Se señala con una flecha el tiempo al que se añade TRH 1  $\mu$ M y el inhibidor E-4031 5  $\mu$ M. A la izquierda se muestran las corrientes obtenidas a los tiempos indicados con un punto negro en el panel de la derecha. Las corrientes fueron registradas utilizando el protocolo detallado en el apartado 4.1.1.2. En la parte inferior se muestra la cuantificación del efecto inhibitorio de la TRH sobre la corriente rERG en células control y transfectadas con 0,5  $\mu$ g de la mezcla de siRNAs contra rPASK.



**Figura 41. Efecto del silenciamiento de hPASK en la regulación hormonal de hERG por TRH en células HEK-H36/T1.** A: Familias de corrientes obtenidas mediante los protocolos detallados en los apartados 4.1.1.2 y 4.2.1.1.3 antes (control) y después de la adición de TRH 1  $\mu$ M a células transfectadas 48 h antes con 0,5  $\mu$ g de la mezcla de siRNAs anti hPASK. B: Curvas I/V obtenidas de familias de corrientes como las ilustradas en A antes (círculos negros) y después (círculos blancos) de la adición de TRH. Los símbolos representan la magnitud de la corriente de cola en el máximo en función del voltaje de despolarización aplicado. El análisis de estos datos se realizó tal y como se detalla en la Figura 17. C: Cuantificación del desplazamiento en la dependencia de voltaje (izquierda) y de la reducción del valor máximo de la corriente de cola (derecha) inducidos por TRH en células control o transfectadas con siRNAs anti hPASK.

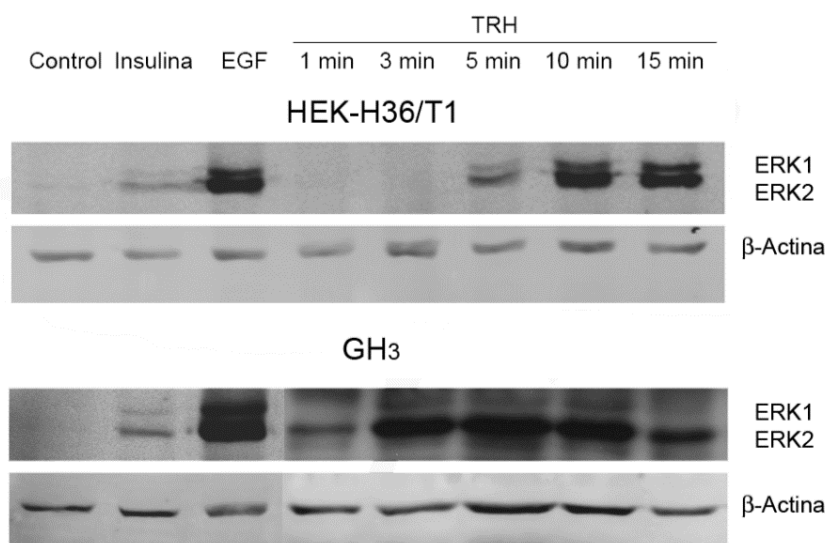
#### 4.2.3. Estudio de la posible implicación de ERK1/2 en la ruta de señalización desde el receptor de TRH hasta los canales *erg*.

Una de las quinasas que resultan activadas por TRH tanto en células GH<sub>3</sub> como HEK293 y otros tipos celulares (Ohmichi *et al.* 1994, Palomero 1998, Tesis Doctoral; Wang y Maurer 1999, Kanasaki *et al.* 1999) es la MAP quinasa ERK1/2, por lo que es también una clara candidata a estar implicada en los efectos de la TRH en la regulación de los canales *erg*. Sin embargo, estudios realizados tanto en nuestro laboratorio sobre los canales rERG endógenos de las células GH<sub>3</sub>, como por el grupo del Dr. Schwarz sobre canales *erg* sobreexpresados en células

#### 4. Resultados.

GH<sub>3</sub>/B6, indicaron que los efectos hormonales permanecían prácticamente inalterados en presencia de los supuestos inhibidores de MEK PD98059 y SB202190 (Schledermann *et al.* 2001, Gómez-Varela *et al.* 2003). Más recientemente se ha analizado el efecto de ambos y se ha encontrado que afectan escasamente a MEK, actuando principalmente sobre la MAPK p38 (Davies *et al.* 2000, Bain *et al.* 2007). Hoy en día existen inhibidores con acción más específica sobre la quinasa MEK de la vía de ERK1/2 (Lee y Duesbery 2010). Por ello y a fin de estudiar más a fondo la posible implicación de esa vía en la inhibición hormonal de los canales *erg*, realizamos estudios de silenciamiento de ERK1/2 mediante RNAi, y de inhibición de la proteína MEK (el único activador de ERK1/2) con PD98059 y con otros dos inhibidores más potentes y específicos, PD184352 y U0126 (Bain *et al.* 2007, Lee y Duesbery 2010).

Para saber en qué condiciones transcurría la fosforilación/activación de ERK1/2 con TRH en nuestros sistemas celulares, comenzamos estudiando ésta en función del tiempo de tratamiento hormonal. Para ello realizamos análisis western de células tratadas con TRH 1  $\mu$ M a diferentes tiempos (1, 3, 5, 10 y 15 min). Además utilizamos como controles positivos de activación de ERK1/2 tratamientos de 10 min con insulina 2  $\mu$ M ó EGF 20 nM, dos conocidos activadores de la ruta de ERK.



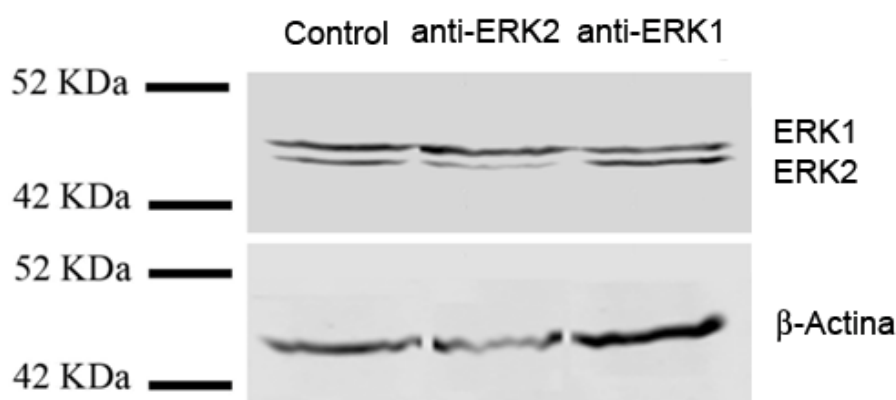
**Figura 42. Activación de ERK1/2 por TRH en células HEK-H36/T1 y GH<sub>3</sub>.** Las células fueron tratadas con TRH 1  $\mu$ M durante el tiempo indicado. Como controles negativos se usaron células sin tratar y como controles positivos de activación se usaron células tratadas 10 min con insulina 2  $\mu$ M o EGF 20 nM. Se muestran las bandas correspondientes a la detección con anticuerpos anti-Phospho p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) y anti- $\beta$ -actina como control de carga.

Como podemos ver en la Figura 42, los tratamientos con insulina y sobre todo con EGF, provocan en ambos tipos celulares una intensa fosforilación en los residuos responsables de la activación de ERK1/2. Sin embargo, el efecto de la TRH sobre la fosforilación es diferente

dependiendo del tipo celular. Así, en las células HEK-H36/T1 hacen falta al menos 5 min de tratamiento para apreciar un aumento de fosforilación, y tras este tiempo la activación de ERK1/2 alcanza niveles muy elevados, comparables a los inducidos por EGF. Sin embargo, en las células GH<sub>3</sub> el aumento en la fosforilación de ERK1/2 ya se aprecia tras 1 min de tratamiento con TRH y alcanza un máximo tras 3 min de tratamiento, manteniéndose estable hasta los 10 min. A tiempos mayores de incubación con TRH la señal ya empieza a decaer. Todo ello sugiere que la ruta de activación de ERK dependiente de TRH podría discurrir por rutas diferentes en ambos tipos celulares.

#### 4.2.3.1. Efectividad del silenciamiento de ERK1 y ERK2 por siRNAs específicos en células HEK-H36/T1 y GH<sub>3</sub>.

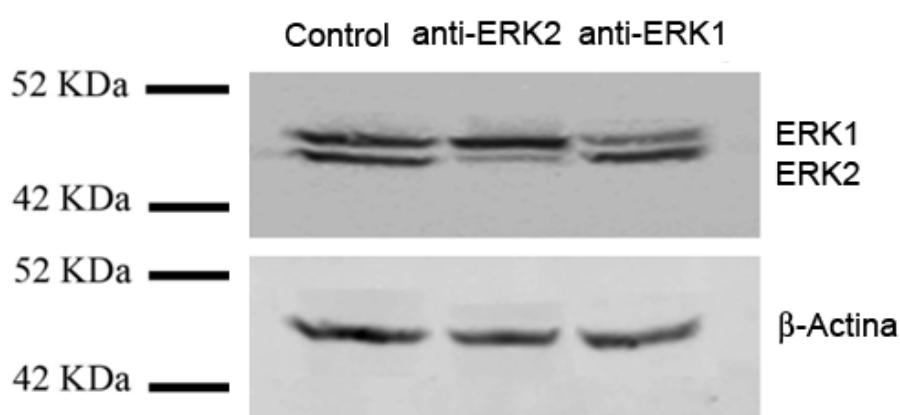
Para estudiar el efecto del bloqueo de la ruta de ERK en la modulación de los canales *erg* por la TRH, nuestro primer abordaje fue silenciar de forma independiente las proteínas ERK1 y ERK2 usando mezclas de siRNAs específicos para los mRNAs correspondientes, en este caso del tipo *siGENOME SMARTpool* de la casa comercial Dharmacon. Estas mezclas están formadas por cuatro siRNAs totalmente específicos para cada mRNA, que combinados garantizan una eficiencia de bloqueo de la expresión proteica en torno al 80 %. Las células control fueron transfectadas con una mezcla de siRNAs sin diana génica o *non-targeting*. Antes de proceder al estudio funcional, estudiamos el efecto de los siRNAs específicos sobre la expresión de las proteínas ERK1 y ERK2 en células GH<sub>3</sub> y HEK-H36/T1 (Figura 43 y Figura 44).



**Figura 43. Efecto de los siRNAs específicos para ERK1 y ERK2 de rata sobre la expresión de las proteínas ERK1 y ERK2 de células GH<sub>3</sub>.** Las células fueron transfectadas con 50 pmoles de los siRNAs correspondientes en placas por duplicado, que se reunieron al recoger las células. Los extractos celulares (50 µg por calle) se analizaron mediante inmunodetección con anticuerpos anti-ERK total y anti-β-actina. Las células control se transfectaron con 50 pmoles de siRNAs *non-targeting*.

#### 4. Resultados.

En la Figura 43 se presenta un experimento representativo en el que la adición a células GH<sub>3</sub> de 50 ng de las mezclas de siRNAs *SMARTpool* dirigidas contra ERK1 o contra ERK2 de rata produce una disminución en la banda correspondiente de 43 kDa y 41 kDa, respectivamente. Se puede observar que el efecto es específico, de forma que cada mezcla de siRNAs actúa disminuyendo sólo los niveles de su isoforma de ERK diana y no los de la otra. El efecto observado es muy evidente para ERK2, aunque algo más débil para ERK1. Este aparente menor efecto, así como cierta variabilidad en cuanto a la potencia de acción de los siRNAs apreciable al comparar varios experimentos, se deben probablemente a la baja y variable eficiencia de transfección de las células GH<sub>3</sub> que ya hemos indicado anteriormente.



**Figura 44. Efecto de los siRNAs específicos para ERK1 y ERK2 humanos sobre la expresión de las proteínas ERK1 y ERK2 de células HEK-H36/T1.** Las células fueron transfectadas con 50 pmoles de los siRNAs correspondientes en placas por duplicado, que se reunieron al recoger las células. Los extractos celulares (50 µg por calle) se analizaron mediante inmunodetección con anticuerpos anti-ERK total y anti-β-actina. Las células control se transfectaron con 50 pmoles de siRNAs *non-targeting*.

En la Figura 44 se muestra un análisis análogo del efecto de los siRNAs específicos sobre los niveles de proteína de las isoformas ERK1 y ERK2 en células HEK-H36/T1. De acuerdo con lo que cabría esperar, en este caso se observa con toda claridad que las mezclas de siRNAs específicas bloquean notable y específicamente la expresión de su proteína correspondiente. Aunque los porcentajes de silenciamiento parecen un poco bajos respecto al 80 % garantizado por la casa comercial, hay que mencionar que en este caso también realizamos la evaluación del silenciamiento en el conjunto de las células de cada placa, es decir, sin seleccionar células fluorescentes transfectadas. Así, aunque la tasa de transfección en estas células es muy superior a la mencionada para células GH<sub>3</sub>, con toda probabilidad los análisis mostrados en ambos casos infravaloran el efecto de las mezclas de siRNAs específicos. Por tanto, y aunque los datos mostrados en las Figura 43 y Figura 44 no reflejan un silenciamiento completo en todas

las células, podemos concluir que las mezclas de siRNAs son capaces de silenciar clara y específicamente ERK1 ó ERK2 tanto en células GH<sub>3</sub> como en células HEK-H36/T1.

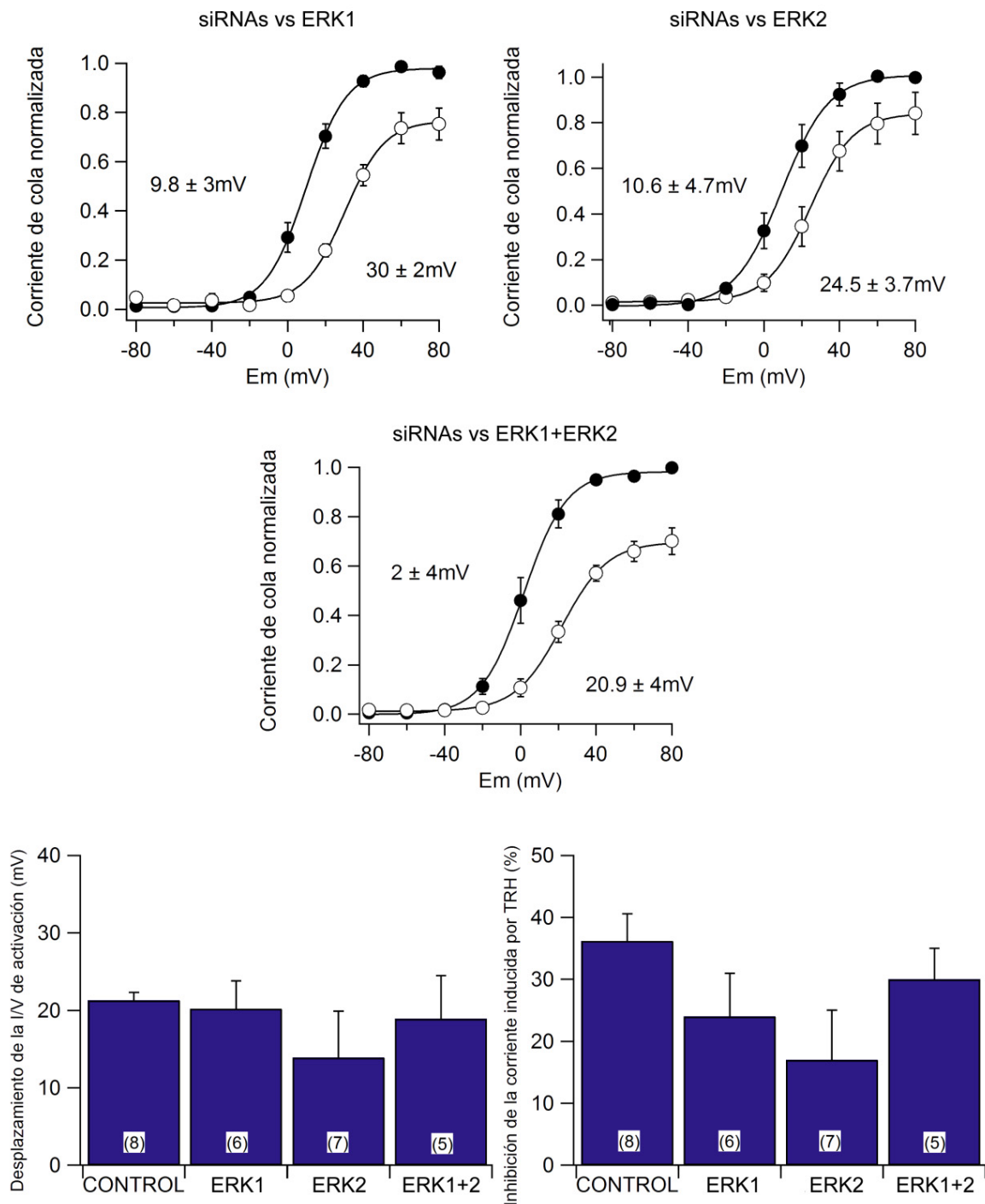
#### **4.2.3.2. Efecto de los siRNAs para ERK1 y ERK2 sobre la regulación de los canales *erg* por TRH en células HEK-H36/T1 y GH<sub>3</sub>.**

Una vez comprobado el efecto de los siRNAs sobre los niveles proteicos de ERK1 y ERK2 en ambos tipos celulares, estudiamos el efecto de este silenciamiento sobre la respuesta de los canales *erg* a la TRH. En primer lugar estudiamos dicho efecto en células HEK-H36/T1, en las que previamente demostramos que la quinasa Akt está implicada en la transducción de la señal. Para ello transfectamos las células con 50 pmoles por placa la mezcla de siRNAs específicos correspondiente o con una combinación de ambas para producir el silenciamiento de las dos isoformas. En todos los casos co-transfectamos las células con 0,5 µg del plásmido pEGFP-C1 como marcador de transfección, y 48 h después de la transfección medimos el efecto de la TRH sobre las corrientes hERG mediante *patch clamp* en la modalidad de parche perforado, utilizando solamente aquellas células con fluorescencia de eGFP, tal y como se ha descrito previamente.

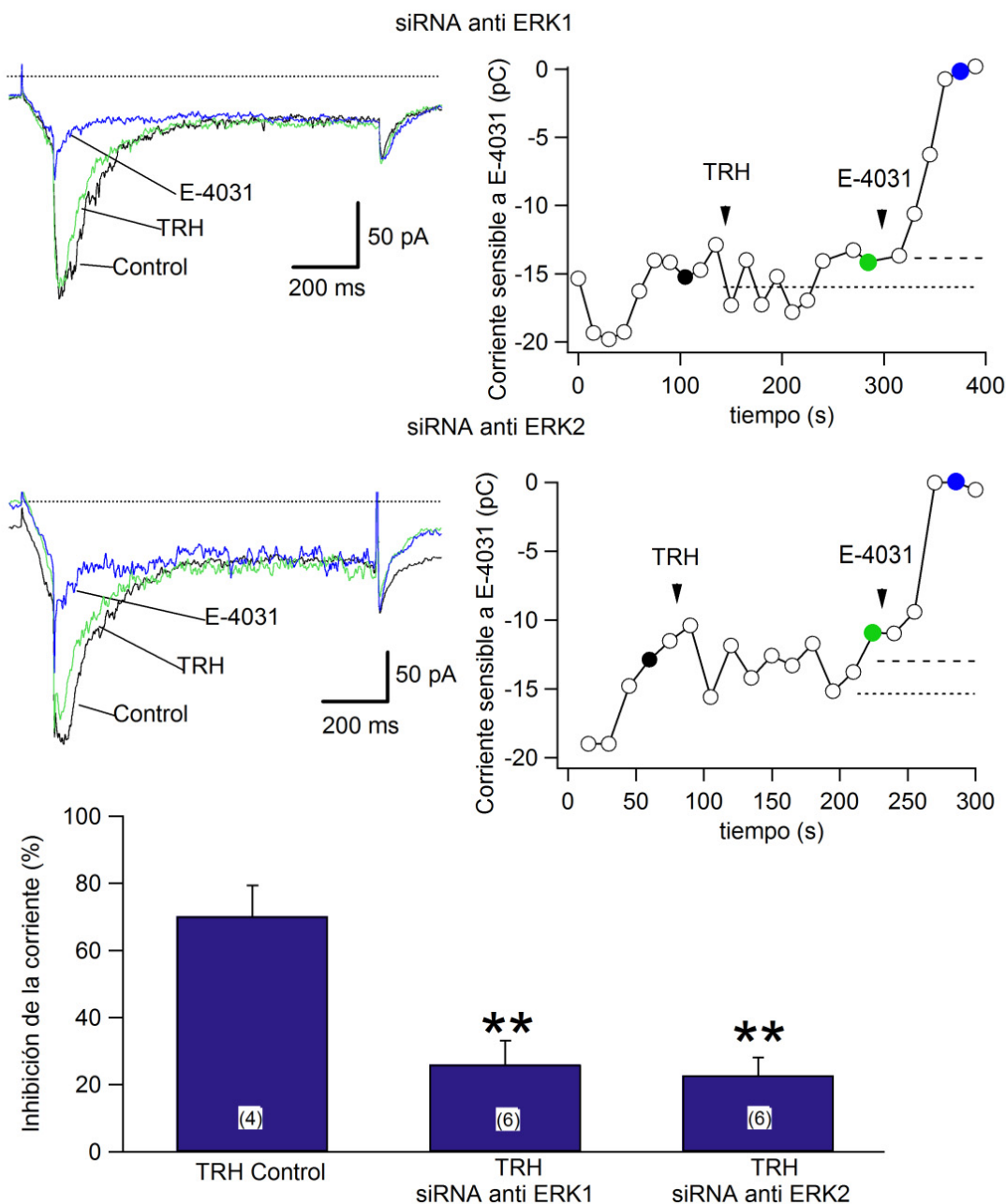
Los datos de los efectos del silenciamiento de ERK1 y ERK2 en células HEK-H36/T1 se presentan en la Figura 45. En las células transfectadas con los siRNAs contra ERK1 la TRH desplazó  $20,2 \pm 3,6$  mV ( $n = 6$ ) la dependencia de voltaje hacia la derecha, en las transfectadas con los siRNAs contra ERK2 el desplazamiento fue de  $13,9 \pm 6$  mV ( $n = 7$ ), y en las transfectadas con ambas mezclas, el desplazamiento provocado por la TRH se mantuvo en  $18,9 \pm 5,6$  mV ( $n = 5$ ). Si comparamos estos efectos con el desplazamiento de la dependencia de voltaje inducido por la TRH en células control, que es de  $21,3 \pm 1$  mV ( $n = 8$ ), vemos que, a pesar de que el silenciamiento de ERK2 reduce ligeramente el desplazamiento, en ningún caso se produce un cambio estadísticamente significativo de este efecto tras silenciar ERK1, ERK2 o ambas con siRNAs específicos. Algo similar ocurre al estudiar la inhibición de la corriente máxima de cola inducida por TRH. En las células con siRNAs contra ERK1 la TRH inhibe un  $24 \pm 7$  % ( $n = 6$ ) de la corriente, y un  $17 \pm 8$  % ( $n = 7$ ) en las células en las que se había silenciado ERK2, mientras que en las transfectadas con ambas mezclas de siRNAs, la TRH reduce un  $30 \pm 5$  % ( $n = 5$ ) de la corriente máxima. Ninguno de estos efectos de reducción de la corriente por TRH es estadísticamente distinto del observado en células control, que es del  $36,2 \pm 4,4$  % ( $n = 8$ ). Por tanto, en las células HEK-H36/T1, el bloqueo de la expresión de ERK1 y de ERK2 no interfiere con la transducción de la señal desde el receptor de TRH a los canales hERG.



#### 4. Resultados.



**Figura 45. Efecto del silenciamiento de ERK1 y ERK2 sobre la respuesta a TRH de los canales hERG en células HEK-H36/T1.** La respuesta a la TRH  $1 \mu\text{M}$  se estudió en células transfectadas 48 h antes con 50 pmoles de siRNAs anti-ERK1 ó anti-ERK2, así como con 50 pmoles de ambos siRNAs. Se muestran las curvas corriente-voltaje antes (círculos negros) y después (círculos blancos) de la adición de TRH. Los círculos representan la media de la magnitud de la corriente de cola en el máximo en función del voltaje de despolarización aplicado, normalizada respecto a su valor máximo a voltajes positivos. Las líneas corresponden a las curvas de Boltzmann ( $h(V) = I_{\text{max}} [1/(1+e^{(V-V_{1/2})/k})]$ ) que mejor se ajustan a los datos. En los histogramas de la parte inferior se indica la cuantificación del desplazamiento en la dependencia de voltaje (izquierda) y la reducción del valor máximo de la corriente de cola (derecha) inducidos por TRH. El número de células estudiadas se muestra entre paréntesis.



**Figura 46. Efecto del silenciamiento de ERK1 y ERK2 sobre la respuesta a TRH de los canales rERG en células GH<sub>3</sub>.** Los datos de los paneles superiores corresponden a células GH<sub>3</sub> representativas transfectadas 48 h antes con 50 pmoles de siRNAs anti ERK1 o anti ERK2, además de 0,5  $\mu$ g del plásmido pEGFP-C1 como marcador de transfección. Se muestran a la izquierda las corrientes registradas utilizando el protocolo detallado en el apartado 4.1.1.2 en ausencia de TRH o tras la adición sucesiva de TRH 1  $\mu$ M y E-4031 5  $\mu$ M. Los trazos de corriente son los correspondientes a los momentos indicados con puntos coloreados en los paneles de la derecha, en los que se representa el curso temporal de las variaciones de las corrientes sensibles al E-4031 en las mismas células. En el panel inferior se muestra la cuantificación de la inhibición de la corriente rERG inducida por TRH en células control o transfectadas con los siRNAs. \*\*  $p < 0,001$  vs control.

De modo similar, analizamos en las células GH<sub>3</sub> el efecto del silenciamiento de ERK1 o ERK2 en la reducción de la corriente rERG inducida por la TRH. De nuevo, las células fueron transfectadas con 50 pmoles por placa de los siRNAs anti-ERK1 o anti-ERK2 y con 0,5  $\mu$ g del plásmido pEGFP-C1 como marcador de transfección. A las 48 h de la transfección se registraron

#### 4. Resultados.

las corrientes de  $K^+$  en las células que expresaban fluorescencia de eGFP como se ha explicado, y los resultados se muestran en la Figura 46. La reducción de la corriente sensible a E-4031 inducida por TRH en células transfectadas con 50 pmoles de los siRNAs anti ERK1 fue de un  $26 \pm 7 \%$  ( $n = 6$ ), mientras que en las células transfectadas con los siRNAs anti ERK2 la reducción alcanzó un  $22,8 \pm 5,2 \%$  ( $n = 6$ ). Estos valores de inhibición son notable y estadísticamente menores a los inducidos por TRH en células control, en las que la TRH reduce el  $70,2 \pm 9,2 \%$  ( $n = 4$ ) de la corriente sensible a E-4031. Por tanto el silenciamiento de la expresión de las proteínas ERK1 o ERK2 sí que afecta a la respuesta de los canales rERG a la TRH en células GH<sub>3</sub> reduciendo en gran medida la inhibición de dichos canales inducida por la hormona. En este caso, las dificultades técnicas asociadas a la transfección de las células GH<sub>3</sub> y el subsiguiente registro en ellas de corrientes *erg* con suficiente reproducibilidad impidieron el estudio de células transfectadas a la vez con siRNAs para ERK1 y ERK2.

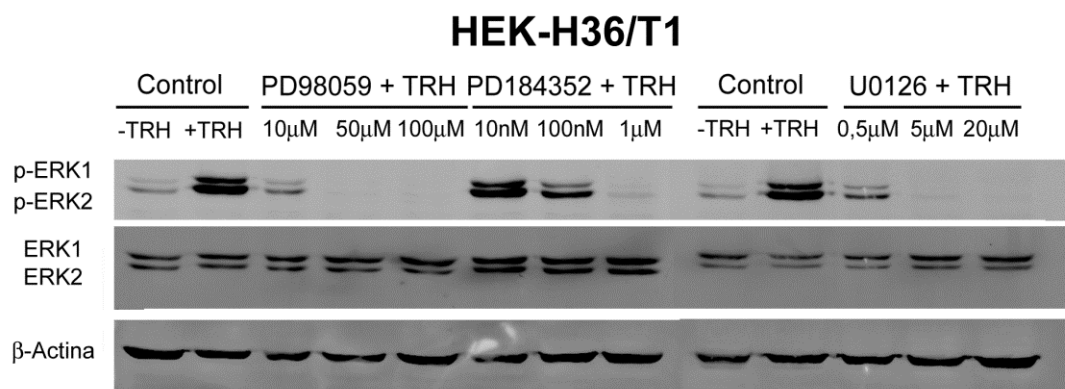
#### 4.2.3.3. Efecto de la inhibición de MEK sobre la respuesta de los canales *erg* a TRH.

Dado que el silenciamiento de la expresión de ERK1 y ERK2 afecta drásticamente a la respuesta de los canales *erg* a la TRH en las células GH<sub>3</sub> pero no en las HEK-H36/T1, decidimos corroborar la existencia de tal diferencia utilizando inhibidores farmacológicos de MEK, la única actividad quinasa responsable de la fosforilación en los sitios de activación de ERK1 y ERK2 (Cargnello y Roux 2011). De esta manera esperábamos descartar la posibilidad de que las diferencias observadas entre ambos tipos celulares se debieran a un bloqueo insuficiente de la expresión de ERK en las células HEK-H36/T1. Para monitorizar la inhibición de MEK estudiamos su efecto a nivel de fosforilación de ERK1/2 y de las corrientes *erg*, y de la respuesta de ambas a TRH. Además, usamos tanto el inhibidor PD98059 utilizado en estudios anteriores (Schledermann *et al.* 2001, Gómez-Varela *et al.* 2003b) cuya IC<sub>50</sub> es de 2  $\mu$ M, como otros dos inhibidores más potentes de MEK1/2, el U0126 con una IC<sub>50</sub> = 0,5  $\mu$ M y el PD184352 con IC<sub>50</sub> = 12 nM (Bain *et al.* 2007, Lee y Duesbery 2010).

#### 4.2.3.3.1. Efecto de los inhibidores de MEK sobre la activación de ERK1/2 por TRH en células HEK-H36/T1 y GH<sub>3</sub>.

En primer lugar, estudiamos el efecto de la inhibición de MEK1/2 sobre la activación de ERK1 y ERK2 en respuesta a TRH y EGF, mediante análisis western de células GH<sub>3</sub> y HEK-H36/T1 tratadas con diferentes concentraciones de cada inhibidor, a fin de estudiar su efectividad en

esos tipos celulares y en nuestras condiciones experimentales, y averiguar la concentración necesaria en cada caso para lograr un bloqueo efectivo de la ruta de ERK. Teniendo en cuenta las IC<sub>50</sub> de cada uno de ellos, hicimos los estudios empleando tres concentraciones distintas en un basado en dichos valores, y asumiendo también que las concentraciones necesarias para la inhibición en células enteras suelen ser superiores a las calculadas *in vitro* (Bain *et al.* 2007, Lee y Duesbery 2010). Así, escogimos para el PD98059 10, 50 y 100  $\mu$ M, para el PD184352 10 nM, 100 nM y 1  $\mu$ M, y para el U0126 0,5, 5 y 20  $\mu$ M. Por otra parte, para averiguar cuál era el tiempo de exposición adecuado, realizamos un análisis western comparando el efecto de los inhibidores sobre células sometidas a tratamientos de 10 y 30 min. Los resultados obtenidos indicaron una eficiencia comparable a 10 y 30 min de exposición (datos no mostrados). Por ello decidimos usar un tiempo de tratamiento de 10 min a fin de minimizar los posibles efectos indeseados sobre las corrientes iónicas y las medidas electrofisiológicas (Gómez-Varela *et al.* 2003b, Thomas *et al.* 2004, 2006; Perry *et al.* 2010). Tras la exposición de 10 min al inhibidor correspondiente, a cada placa se le añadió TRH 1  $\mu$ M y se dejó actuar durante 5 min. También se establecieron controles de células sin tratar y de células tratadas solamente con TRH. A continuación se detuvieron los tratamientos y se analizó el efecto de los mismos mediante análisis western, con anticuerpos anti-fosfo ERK y anti ERK total. Los datos obtenidos en un experimento representativo se muestran a continuación.



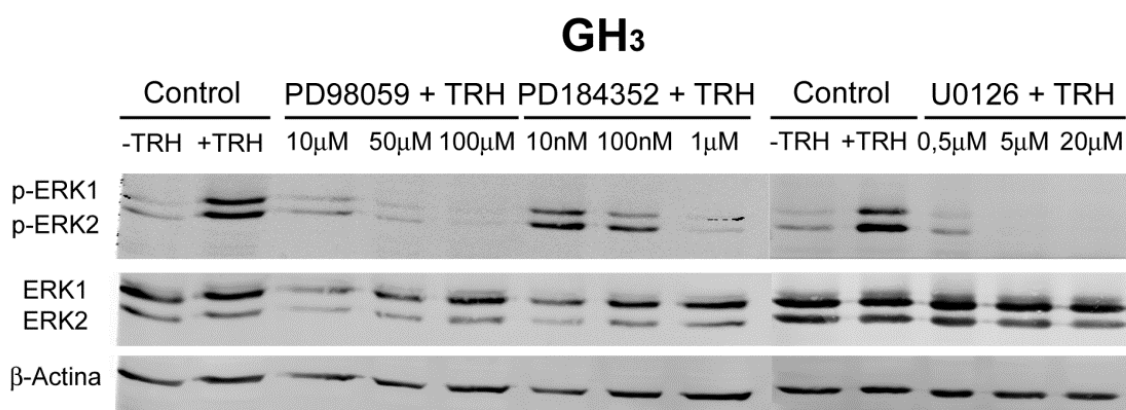
**Figura 47. Efecto de los inhibidores de MEK sobre la fosforilación de ERK1/2 en células HEK-H36/T1 tratadas con TRH.** Los inhibidores se usaron a la concentración indicada durante 10 min y tras este tiempo se añadió TRH 1  $\mu$ M, dejándola actuar durante 5 min. Las células se trataron con los agentes indicados en placas por duplicado y se reunieron tras ser recogidos. Los extractos (100  $\mu$ g de proteína) se analizaron mediante inmunodetección con anticuerpos anti-fosfo-ERK (panel superior), anti-ERK total (panel central) y anti- $\beta$ -actina (panel inferior).

En la Figura 47 se observa que en células HEK-H36/T1 tratadas con cada uno de los tres inhibidores y con TRH 1  $\mu$ M hay una disminución de los niveles de fosfo-ERK1/2 en comparación con los de células tratadas sólo con TRH, disminución que es más notable a

#### 4. Resultados.

medida que aumentan las concentraciones de aquéllos. Como era previsible, no se observa ninguna una alteración apreciable de la relación ERK total/ $\beta$ -actina. En el caso del PD98059, las tres concentraciones usadas provocan disminución de los niveles de fosfo-ERK1/2, que casi alcanzan los valores del control sin TRH ya a 10  $\mu$ M. En el caso del PD184352 se aprecia un efecto claro a una concentración de 100 nM, pero es a 1  $\mu$ M donde se aprecia una inhibición completa de la fosforilación de ERK1/2. En cuanto al U0126 se aprecia ya a 0,5  $\mu$ M una inhibición casi total de la fosforilación de ERK dependiente de TRH. Podemos pues decir que, al menos en nuestras condiciones experimentales, la activación de ERK1/2 por TRH es totalmente abolida en las células HEK-H36/T1, incluso hasta niveles por debajo de las células control, usando MEK PD98059 a concentración 50  $\mu$ M, PD184352 a 1  $\mu$ M y U0126 a 5  $\mu$ M.

En lo que respecta a las células GH<sub>3</sub>, en la Figura 48 se observa que los tres inhibidores provocan una disminución progresiva de los niveles de fosfo-ERK1/2 de las células tratadas con TRH 1  $\mu$ M a medida que se aumentan sus concentraciones, sin una alteración apreciable de la relación ERK total/ $\beta$ -actina. En el caso del PD98059 las tres concentraciones usadas provocan disminución de los niveles de fosfo-ERK1/2, que alcanzan los valores del control sin TRH (o menores) entre 50 y 100  $\mu$ M. En el caso del PD184352 se ve un cierto efecto ya a una concentración de 10 nM, pero la inhibición de la fosforilación de ERK1/2 hasta los valores comparables a los del control sin TRH sólo se observa a 1  $\mu$ M. Por su parte, el U0126 inhibe casi totalmente la fosforilación de ERK dependiente de hormona ya a 0,5  $\mu$ M. Por tanto, en nuestras condiciones hemos conseguido bloquear completamente la activación de ERK1/2 de las células GH<sub>3</sub> a concentraciones de PD98059 entre 50 y 100  $\mu$ M, de PD184352 1  $\mu$ M y de U0126 5  $\mu$ M.



**Figura 48. Efecto de los inhibidores de MEK sobre la fosforilación de ERK1/2 en células GH<sub>3</sub> tratadas con TRH.** Los inhibidores se usaron a la concentración indicada durante 10 min y tras este tiempo se añadió TRH 1  $\mu$ M, dejándola actuar durante 5 min. Las células se trataron con los agentes indicados en placas por duplicado y se reunieron tras ser recogidos. Los extractos (100  $\mu$ g de proteína) se analizaron mediante inmunodetección con anticuerpos anti-fosfo-ERK, anti-ERK total y anti- $\beta$ -actina.

#### **4.2.3.3.2. Efecto de los inhibidores de MEK sobre la modulación hormonal de los canales hERG por la TRH en células HEK-H36/T1.**

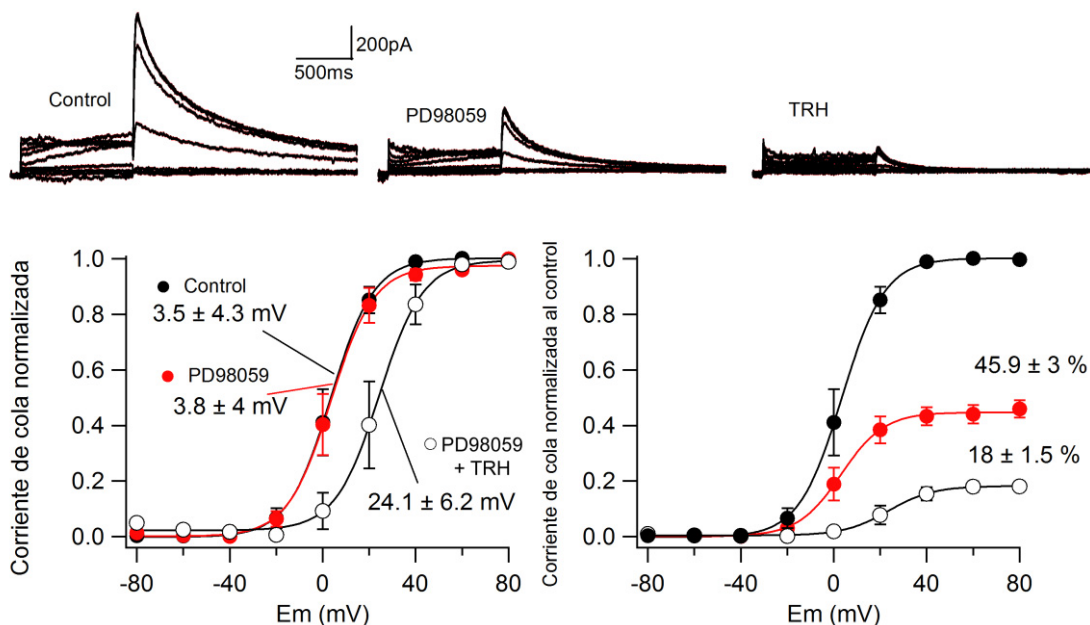
Una vez estudiada la eficacia de los inhibidores de MEK y determinadas las concentraciones óptimas de cada uno de ellos para inhibir la activación de ERK1/2, pasamos a estudiar el efecto que causaban los mismos sobre la modulación de los canales *erg* por la TRH en los dos tipos celulares. En primer lugar realizamos el estudio en células HEK-H36/T1. Para ello registramos las corrientes de las células tal y como se ha descrito anteriormente. Tras una medida inicial de las corrientes hERG, tratamos la célula con la concentración deseada del inhibidor de MEK correspondiente durante 10 min, para a continuación añadir TRH 1  $\mu$ M y estudiar el efecto hormonal sobre los canales hERG.

En la Figura 49 se muestran ejemplos de corrientes y los datos del efecto de PD98059 100  $\mu$ M en la dependencia de voltaje y la inhibición de la corriente máxima de cola, así como los cambios producidos por la adición subsiguiente de TRH 1  $\mu$ M. Para facilitar la comparación visual de los efectos del inhibidor sobre estos dos parámetros presentamos dos grupos de curvas I/V. En las de la derecha, las corrientes se han normalizado respecto a la corriente máxima de las células control, y se observa fácilmente la inhibición de la corriente máxima de cola producida tras los dos tratamientos sucesivos. En las de la izquierda, las corrientes han sido normalizadas respecto a la corriente máxima en cada tratamiento, y se pueden apreciar los cambios en la dependencia de voltaje producida por el inhibidor y la TRH. También se llevaron a cabo experimentos similares con los otros dos inhibidores de MEK a concentraciones de 1  $\mu$ M para el PD184352 y de 5  $\mu$ M para el U0126. El resumen de los datos obtenidos con estos tratamientos se muestra en la Figura 50.

Comenzando con el inhibidor PD98059, se puede observar que en ausencia de hormona la dependencia de voltaje de activación de hERG no es afectada por la presencia del mismo (desplazamiento de la I/V  $0,33 \pm 0,6$  mV,  $n = 3$ ). Además, la adición posterior de TRH provoca un desplazando la dependencia de voltaje de  $20,3 \pm 2,2$  mV ( $n = 3$ ), totalmente análoga a la observada en células control ( $22,2 \pm 4,2$  mV,  $n = 5$ ). La nula efectividad del PD98059 sobre el efecto de la TRH en la posición de la I/V tuvo lugar a pesar de que la corriente de  $K^+$  mediada por hERG fue reducida un  $54,1 \pm 3,2$  % por el propio inhibidor a esa relativamente alta concentración, y que la corriente remanente en su presencia fue ulteriormente reducida un ( $60,8 \pm 0,7$  %) al añadir la TRH. Esta disminución, mucho más elevada de lo habitual en lo que respecta a la TRH ( $26 \pm 1,9$  %) en las células control, probablemente está relacionada con la

#### 4. Resultados.

importante inhibición previa de los canales causada por el propio PD98059. Por su parte, la adición de PD184352 1  $\mu\text{M}$  tampoco afectó a la dependencia de voltaje del canal (desplazamiento de la I/V  $0,25 \pm 2,5$  mV), y produjo una menor reducción de la corriente máxima de cola ( $7,6 \pm 6,8$  %). Además, de nuevo el posterior tratamiento con TRH 1  $\mu\text{M}$  en presencia de PD184352 desplazó la  $V_{50}$  y redujo la corriente de cola  $19,1 \pm 5,4$  mV y  $25,8 \pm 8,8$  % respectivamente, unos valores asimismo similares a los observados tras el tratamiento con TRH de las células control. Finalmente, el tratamiento de 10 min con U0126 5  $\mu\text{M}$  causó también una reducción del nivel de corriente de las células de  $18,2 \pm 4,2$  %, aunque apenas modificó su dependencia de voltaje (desplazamiento de la I/V de  $0,4 \pm 0,1$  mV). En este caso, la adición de TRH 1  $\mu\text{M}$  indujo asimismo un desplazamiento en la dependencia de voltaje de  $26,9 \pm 0,3$  mV y una inhibición de la corriente máxima de cola de un  $25 \pm 8,8$  %.

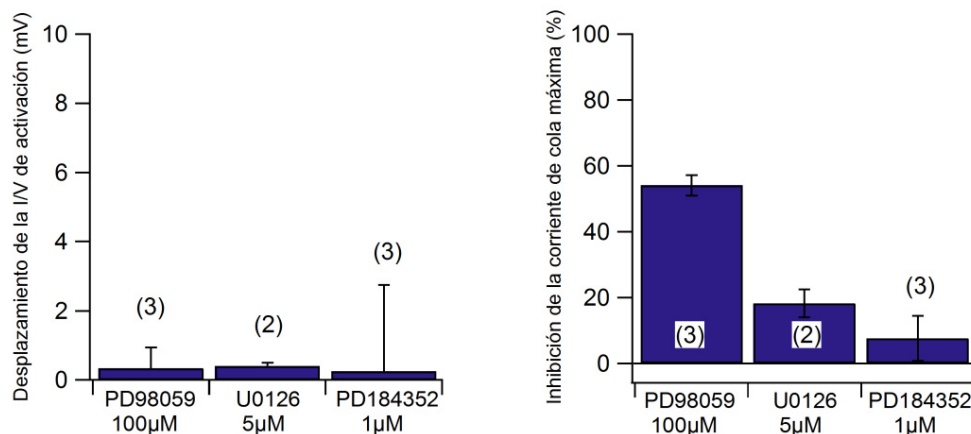


**Figura 49. Efecto del inhibidor de MEK PD98059 sobre las corrientes hERG y su respuesta a TRH en células HEK-H36/T1.** El estudio se realizó sobre corrientes obtenidas tras despolarizaciones a voltajes desde 80 mV a -80 mV utilizando un protocolo como el detallado en el apartado 4.1.1.2. Las corrientes de la parte superior de la figura corresponden a una célula representativa en condiciones control, tras la adición de PD98059 100  $\mu\text{M}$  durante 10 min y tras la adición posterior de TRH 1  $\mu\text{M}$ . En la parte inferior se muestran las curvas I/V obtenidas del análisis de las familias de corrientes como las ilustradas en la parte superior, tal y como se indica en la Figura 17, al principio del experimento (círculos negros), tras el tratamiento con PD98059 (círculos rojos) y después de la adición de 1  $\mu\text{M}$  de TRH (círculos blancos).

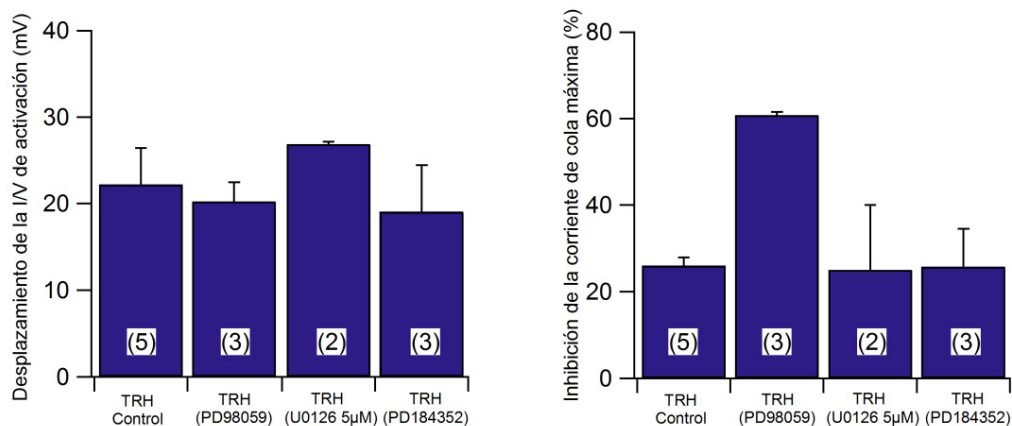
Así pues, con todos estos datos podemos decir que la inhibición de MEK1/2, y por tanto el bloqueo en la ruta de activación de ERK1/2, no afecta de forma significativa a la dependencia de voltaje de hERG en las células HEK-H36/T1. Además, aunque el tratamiento con concentraciones relativamente elevadas de los inhibidores produce una reducción sustancial de

la corriente del canal, ésta se debe probablemente a una inhibición inespecífica del canal y no a su acción sobre MEK, puesto que tras los tratamientos con menores concentraciones o tras el silenciamiento de ERK1 y ERK2 dicha inhibición no se detecta. En todo caso, incluso en estas condiciones considerablemente desfavorables, la respuesta de los canales hERG a la TRH no es modificada, a pesar de que la hormona sí es capaz de inducir un aumento muy notable de la fosforilación de ERK1 y ERK2 en estas células (ver Figura 42 y Figura 47). Por tanto, podemos concluir que la activación de ERK1 y ERK2 no está implicada en la regulación de hERG por la TRH en las células HEK-H36/T1.

Efecto de los inhibidores de MEK sobre la dependencia de voltaje y la corriente máxima de hERG.



Efecto de la TRH sobre la dependencia de voltaje y la corriente máxima de hERG tras el tratamiento con los inhibidores de MEK



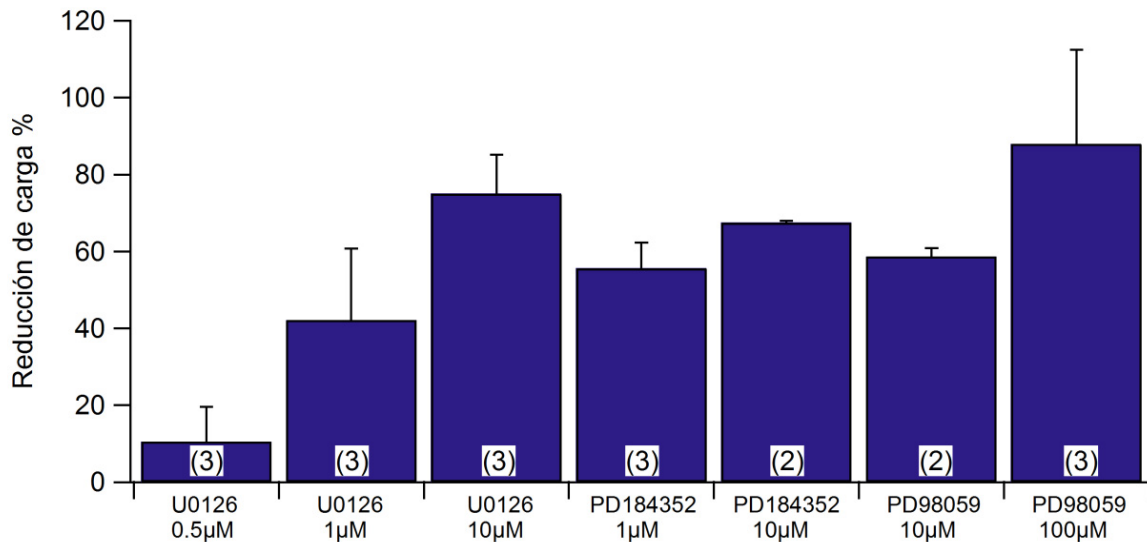
**Figura 50. Resumen del efecto de los inhibidores de MEK sobre las corrientes hERG y su respuesta a TRH en células HEK-H36/T1.** En la parte superior se muestran los efectos del tratamiento durante 10 min con los distintos inhibidores de MEK a la concentración indicada. A la izquierda se representa el efecto sobre la dependencia de voltaje y a la derecha la inhibición de la corriente máxima producida por cada inhibidor. En la parte inferior se indican los efectos del tratamiento con TRH 1 µM durante 5 min a células control o tratadas con cada uno de los inhibidores de MEK. A la izquierda se muestra el efecto de la hormona sobre la dependencia de voltaje del canal y a la derecha la inhibición de la corriente máxima de cola. Se indica entre paréntesis el número de células analizadas en cada caso.



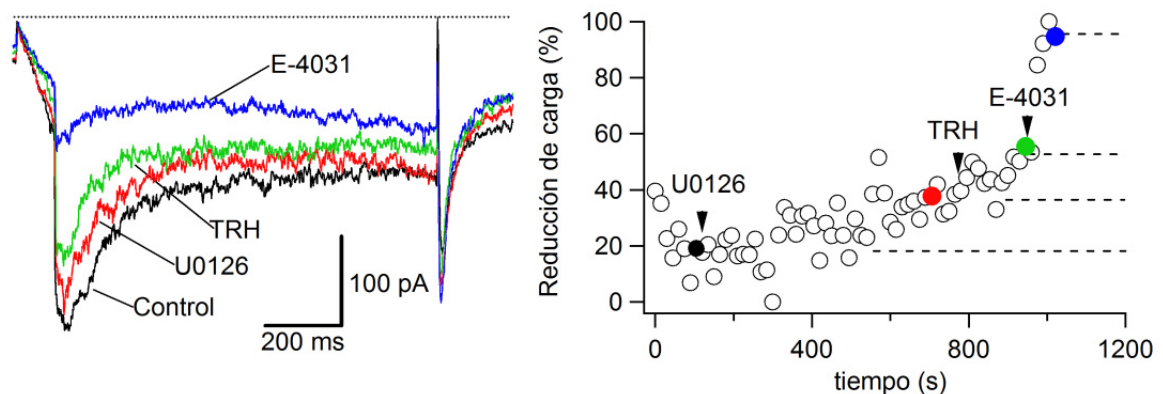
#### 4. Resultados.

##### **4.2.3.3.3. Efecto de los inhibidores de MEK sobre la modulación hormonal de los canales rERG por la TRH en células GH<sub>3</sub>.**

Al contrario de lo que ocurre en las HEK-H36/T1, en las células GH<sub>3</sub> el silenciamiento de ERK1 y ERK2 produce una notable reducción de la inhibición de los canales rERG por la TRH. Por tanto, los estudios con inhibidores de MEK tienen especial interés en este tipo celular, para así poder confirmar la implicación de la ruta de ERK en la transducción de la señal desde el receptor de TRH hasta los canales *erg*. Por ello, utilizando la técnica de *patch clamp* en la modalidad de parche perforado, estudiamos las corrientes de K<sup>+</sup> sensibles a E-4031 de las células GH<sub>3</sub>. Tras obtener una línea basal estable, se añadió el inhibidor de MEK correspondiente durante 10 min, tras lo cual se añadió TRH 1 μM durante 5 min, y finalmente el inhibidor de canales *erg* E-4031 para poder cuantificar la magnitud de las corrientes que corresponden a rERG. En estas células, al solo poder registrar los cambios en la magnitud de la corriente, es necesario minimizar lo más posible el efecto inespecífico de inhibición causado por los propios agentes químicos. Desafortunadamente, como se resume en la Figura 51, observamos que el PD98059 inhibía *per se* una fracción muy notable de la corriente rERG tanto a 100 μM (un 87,93 ± 24,5 %) como a 10 μM, (un 58,6 ± 2,2 %). Esto imposibilitó estudiar con garantías el efecto de la TRH tras el tratamiento con este inhibidor. Un problema análogo se encontró en el caso del PD184352, pues al tratar las células con una concentración 1 μM del mismo la corriente rERG se redujo un 55,6 ± 6,7 % y esta inhibición fue aún mayor tras el tratamiento con 10 μM (67,5 ± 0,5 %). Respecto al inhibidor U0126, aunque a concentraciones de 10 y 1 μM también afectó notablemente la corriente rERG disminuyéndola un 73,5 ± 9 % y un 42,13 ± 18,6 % respectivamente, a una concentración de 0,5 μM durante 10 min sólo inhibió un 10,5 ± 9 % de la corriente, lo cual permite su uso para estudiar de forma más fiable el posterior efecto inhibitorio de la TRH (Figura 51 y Figura 52).



**Figura 51. Efecto de los inhibidores de MEK1/2 sobre la corriente rERG en células GH<sub>3</sub>.** Se indica la reducción de la corriente de K<sup>+</sup> sensible a E-4031 producida tras un tratamiento de 10 min con los inhibidores de MEK a las concentraciones indicadas. Los datos se muestran como la media del porcentaje de inhibición de la corriente más S.E.M. en el número de células indicado entre paréntesis.



**Figura 52. Efecto del U0126 sobre las corrientes rERG y su respuesta a TRH en células GH<sub>3</sub>.** A la izquierda, se muestran las corrientes registradas utilizando el protocolo detallado en el apartado 4.1.1.2 en una célula representativa al comienzo del experimento (Control), tras un tratamiento de 10 min con U0126 0,5 μM, y tras la ulterior adición de TRH 1 μM y E-4031 5 μM. Los registros de corriente son los correspondientes a los momentos indicados con puntos coloreados a la derecha, donde se representa el curso temporal de las variaciones de las corrientes iónicas sensibles a E-4031 en dicha célula. Los datos corresponden al total de carga obtenida entre el comienzo y el final de la hiperpolarización a -100mV.

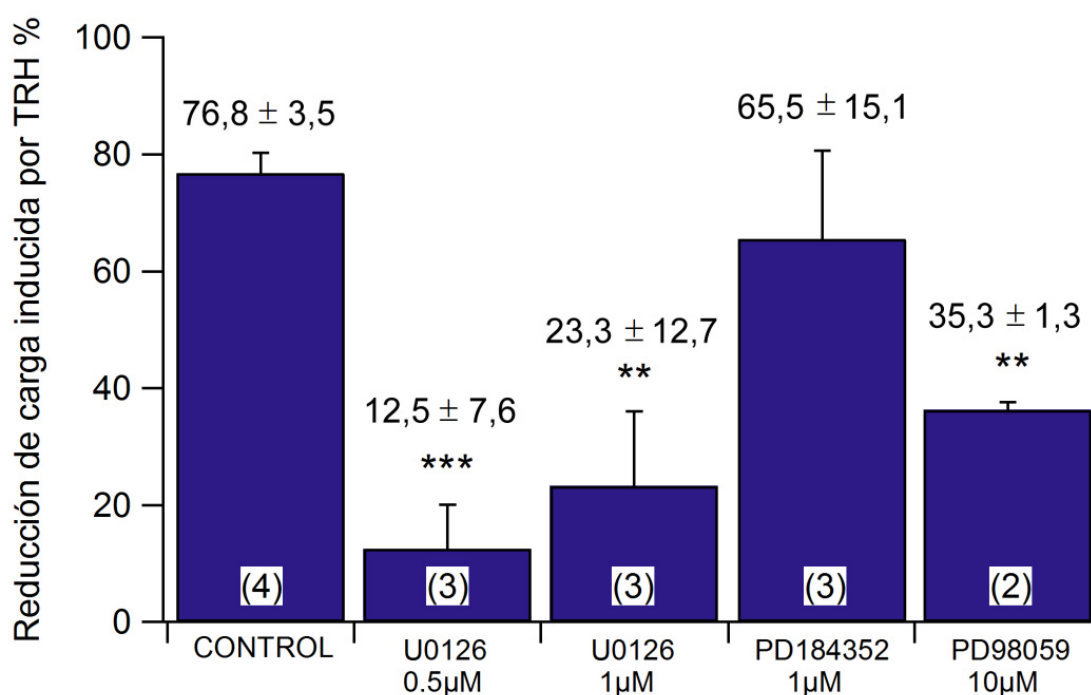
Por último, en la

Figura 53 se muestra un resumen de los efectos de la TRH sobre las corrientes rERG de las células GH<sub>3</sub> tratadas con los tres inhibidores de MEK a las concentraciones indicadas. Considerando tan sólo las concentraciones que causan *per se* una menor inhibición de las corrientes rERG, se puede apreciar que mientras el PD98059 reduce significativamente el efecto hormonal, el PD184352 no afecta a la inhibición causada por la adición ulterior de TRH. Nótese sin embargo que en ambos casos la corriente remanente tras el tratamiento con el

#### 4. Resultados.

inhibidor es menos de la mitad de la inicial (Figura 51), dificultando la obtención de una conclusión fiable respecto al efecto de la propia TRH. Algo similar puede argüirse en el caso del U0126 1  $\mu$ M, que a pesar de limitar la inhibición por la TRH a un 23,3 %, ya causa *per se* una reducción de la corriente inicial cercana al 40 %. Afortunadamente, los datos de las células tratadas con U0126 0,5  $\mu$ M sí resultan particularmente interesantes. Así, a esa concentración a la que el inhibidor prácticamente no altera la corriente inicial (Figura 51), la adición posterior de TRH tan solo es capaz de reducir las corrientes un  $12,5 \pm 7,6$  %, un efecto mucho menor que el observado en células GH<sub>3</sub> control en las que la TRH produce una inhibición del  $76,8 \pm 3,5$  % de la corriente de K<sup>+</sup> sensible a E-4031 (

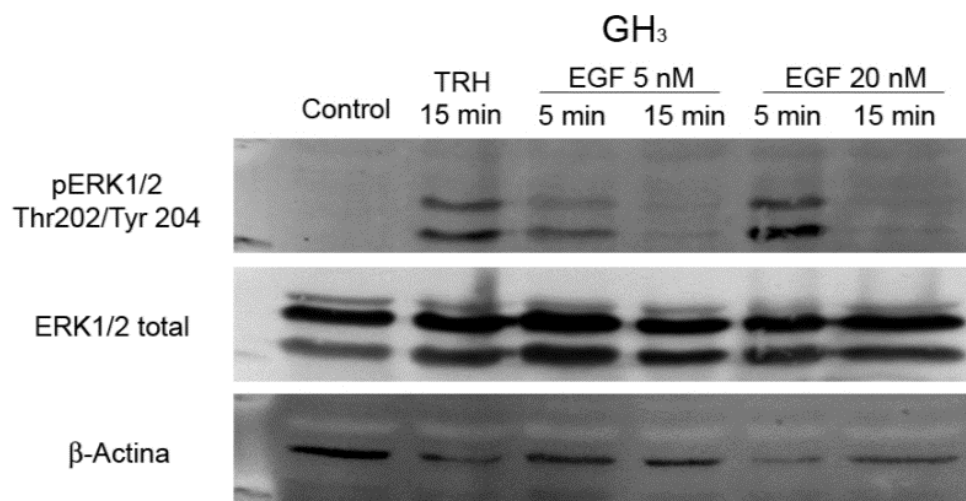
Figura 53). Por tanto, junto con los datos obtenidos mediante silenciamiento de ERK1 y ERK2, podemos concluir que, a diferencia de lo observado con las células HEK-H36/T1, el bloqueo de la ruta de ERK en las células GH<sub>3</sub> inhibe de modo efectivo la respuesta de los canales rERG a la TRH.



**Figura 53. Efecto de los inhibidores de MEK1/2 sobre la inhibición de rERG por TRH en células GH<sub>3</sub>.** Se indica la reducción de la corriente de K<sup>+</sup> sensible a E-4031 producida tras un tratamiento con TRH 1  $\mu$ M en células GH<sub>3</sub> control o tratadas durante 10 min con las concentraciones indicadas de los inhibidores de MEK1/2. Los datos se muestran como la media más S.E.M. del número de experimentos indicados entre paréntesis.

#### 4.2.3.4. Efecto del EGF en la modulación por la TRH de los canales rERG de las células GH<sub>3</sub>.

Como hemos visto, el tratamiento con TRH produce una importante activación por fosforilación de las proteína quinasas ERK1 y ERK2 en células GH<sub>3</sub>, mientras el silenciamiento (y la inhibición farmacológica) de las mismas reduce de forma drástica la inhibición de la corriente rERG inducida por TRH. Por ello decidimos estudiar si para observar el efecto que tiene ERK1/2 sobre la modulación hormonal de *erg* por la TRH solo es necesaria su activación o es necesario algo más. Para ello estudiamos el efecto de la activación de las ERK1/2 de forma independiente de TRH sobre la corriente rERG en las células GH<sub>3</sub>. Utilizamos en este caso EGF, un activador potente y ampliamente descrito de ERK1/2 en este tipo celular (Zhang *et al.* 2008). En primer lugar comprobamos la activación efectiva de ERK1 y ERK2 por EGF mediante análisis western, detectando tanto la forma activa fosforilada como el total de proteína ERK.



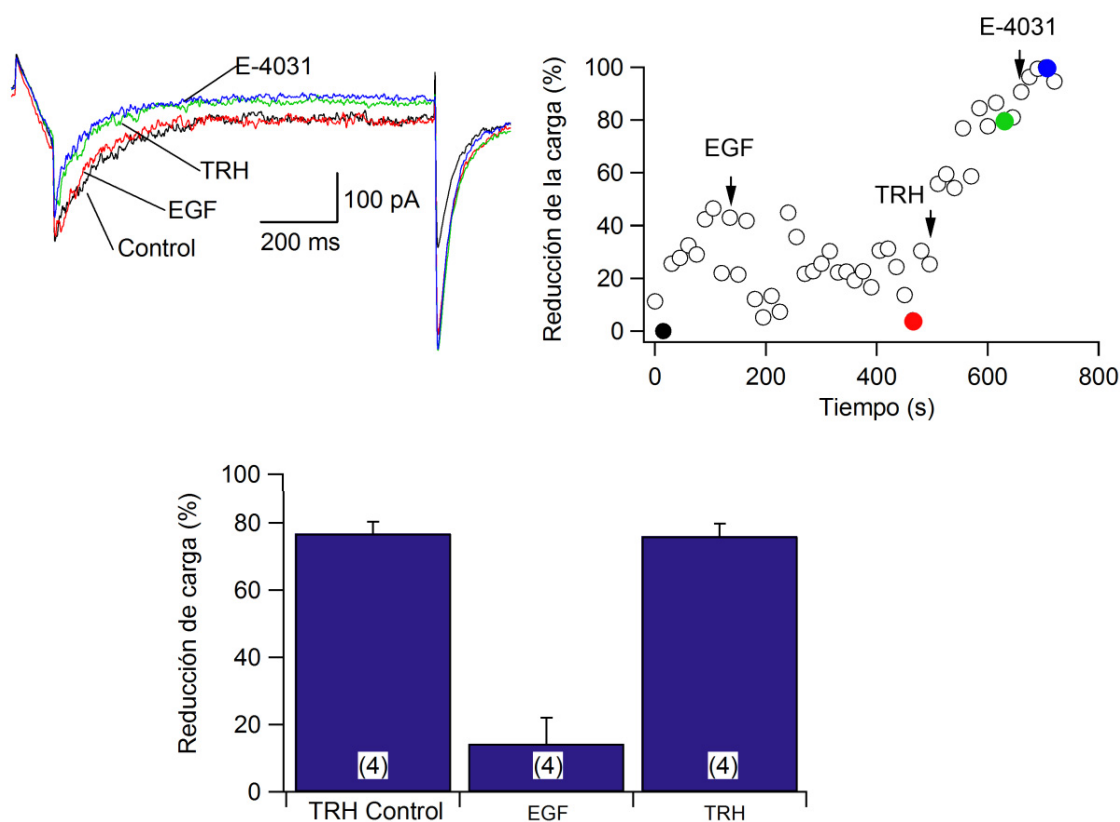
**Figura 54. Activación de ERK1/2 por EGF en células GH<sub>3</sub>.** Las células fueron tratadas con 5 ó 20 nM de EGF durante 5 ó 15 min. Como controles se usaron células sin tratar o tratadas 15 min con TRH 1  $\mu$ M. Se muestran las bandas correspondientes a la detección con anticuerpos anti-Phospho p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) y con anti p44/42 MAPK (Erk1/2) o anti- $\beta$ -actina como controles de carga.

En la

Figura 54 podemos ver que EGF es capaz de inducir fosforilación de ERK1/2, tanto a concentraciones de 5 nM como de 20 nM, si bien esta activación se produce de forma más pasajera que la inducida por TRH en este tipo celular. Esto sugiere ya que quizá existan diferencias en la forma cómo se produce esa activación en función del estímulo utilizado. A continuación, estudiamos el posible efecto de la activación por EGF sobre las corrientes rERG y sobre su modulación por TRH, realizando las medidas electrofisiológicas correspondientes como hemos explicado anteriormente. Para ello, realizamos un tratamiento de 5 min con EGF

#### 4. Resultados.

20 nM y analizamos tanto los efectos de éste como su influencia sobre la posterior respuesta de rERG a la TRH. Como se aprecia en la Figura 55, el tratamiento con EGF no parece afectar prácticamente a las corrientes rERG, pues solo se observa una ligera disminución de la corriente del  $14,3 \pm 7,8 \%$  ( $n = 4$ ). Además, la posterior adición de TRH 1  $\mu\text{M}$  produjo un efecto casi idéntico al observado en células control, reduciendo la corriente de  $\text{K}^+$  sensible a E-4031 en un  $76 \pm 3,8 \%$  ( $n = 4$ ). Por tanto, al menos en las células adenohipofisarias  $\text{GH}_3$ , el tratamiento con EGF y la correspondiente activación de ERK1/2 no parece suficiente para afectar de modo apreciable ni a la propia actividad de los canales rERG ni a su ulterior respuesta a la TRH.



**Figura 55. Efecto del EGF sobre las corrientes rERG y su respuesta a TRH en células  $\text{GH}_3$ .** En la parte superior izquierda se muestran las corrientes de una célula representativa en respuesta al protocolo detallado en el apartado 4.1.1.2 tanto al comienzo del experimento (Control), como tras un tratamiento de 5 min con EGF 20 nM y tras la sucesiva adición de TRH 1  $\mu\text{M}$  y E-4031 5  $\mu\text{M}$ . Los registros de corriente son los correspondientes a los momentos indicados con puntos coloreados en el panel de la derecha, donde se representa el curso temporal de las variaciones de las corrientes sensibles a E-4031 en dicha célula. Los datos corresponden al total de carga obtenida entre el comienzo y el final de la hiperpolarización a -100mV. En la parte inferior se muestra la cuantificación de la inhibición de la corriente rERG en células control tratadas con TRH, en células tratadas 5 min con EGF 20 nM y tras la adición de TRH 1  $\mu\text{M}$  después del tratamiento con EGF.

### **4.3. Estudio de los cambios en fosforilación provocados por el tratamiento de células GH<sub>3</sub> y HEK-H36/T1 con la hormona TRH.**

Tras estudiar la posible implicación de las proteína quinasas Akt, PASK y ERK en la regulación de los canales *erg* por TRH en células GH<sub>3</sub> y HEK-H36/T1, nos propusimos analizar cómo afectaba el tratamiento con esa hormona a la fosforilación de las proteínas de ambos tipos celulares. Dado que datos de nuestro laboratorio indican que es necesario un proceso de fosforilación para la transducción de la señal desde el receptor de TRH hasta los canales *erg* (Barros *et al.* 1993), pensamos que el estudio de los cambios en el fosfoproteoma de estos dos tipos celulares antes y después del tratamiento con TRH nos podría ayudar a identificar posibles dianas de fosforilación, bien sean sustratos, quinasas o fosfatasa, que estuviesen implicadas en dicha transducción de señales. Para ello comenzamos realizando análisis mediante electroforesis bidimensionales para detectar manchas o *spots* de proteínas con cambios en la movilidad electroforética causados por fosforilaciones y desfosforilaciones inducidas por TRH, seguido de una identificación de las manchas cambiantes mediante espectrometría de masas MALDI-ToF. En un segundo abordaje experimental estudiamos los cambios globales en el fosfoproteoma de los dos tipos celulares en respuesta a la TRH, usando una técnica de espectrometría de masas cuantitativa aplicada a mezclas de fosfopéptidos obtenidas a partir de extractos celulares tripsinizados mediante cromatografía en dióxido de titanio.

#### **4.3.1. Análisis de los cambios en fosforilación en respuesta a TRH mediante electroforesis bidimensional y espectrometría de masas MALDI-ToF.**

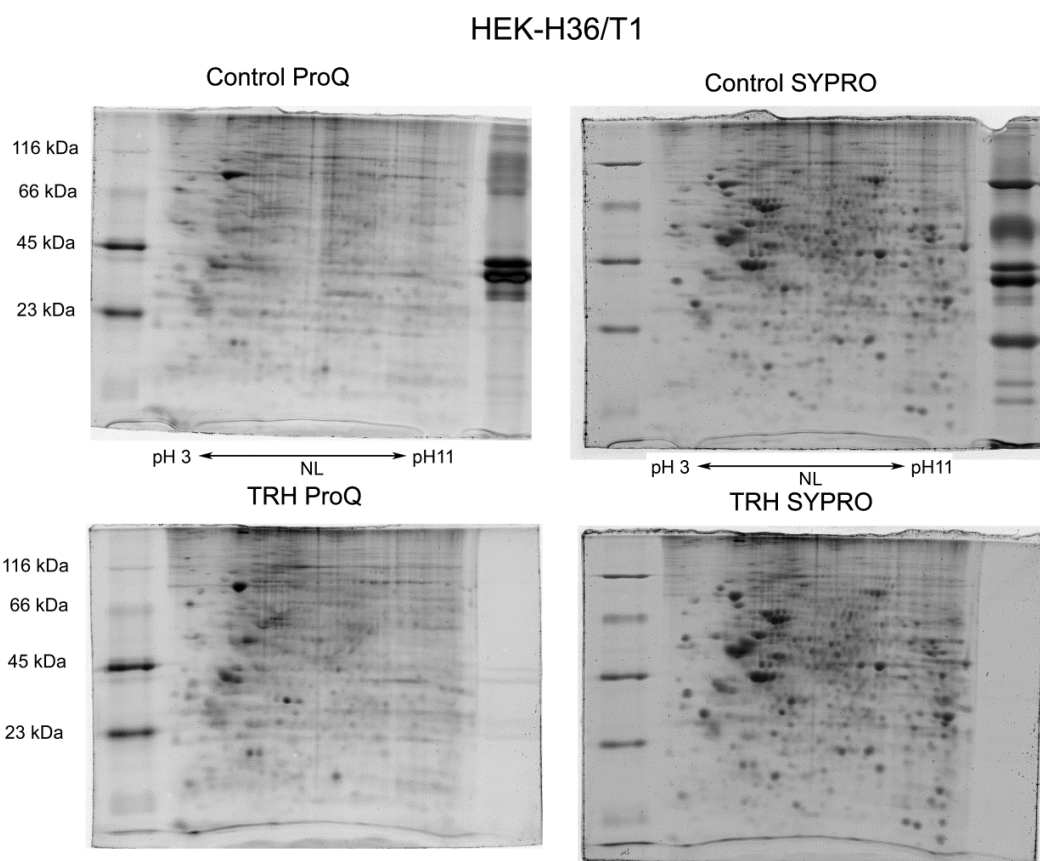
Como acabamos de indicar, nuestra primera aproximación fue estudiar los cambios en los estados de fosforilación de las proteínas tras un tratamiento con TRH, usando 2D-PAGE y observando los cambios en la movilidad electroforética inducidos por el aumento o disminución del número de fosforilaciones: la fosforilación acidifica las proteínas y por tanto disminuye su punto isoelectrónico, desplazando hacia pH menores su isoelectroenfoque. Así, utilizando tanto células GH<sub>3</sub> como HEK-H36/T1, recogimos extractos sin tratar o tratados con TRH 1  $\mu$ M durante 5 min. La preparación de las muestras para 2D-PAGE (ver Métodos) es incompatible con los ensayos de medida de proteína. Así, para asegurarnos de cargar la misma cantidad de proteína en cada muestra realizamos un gel de carga con distintas cantidades de cada una, y luego igualamos las concentraciones de los extractos. Se cargaron 150  $\mu$ l de cada extracto (aproximadamente 500  $\mu$ g) en un gel de isoelectroenfoque de rango de pH 3-11 no lineal, y se realizó el isoelectroenfoque seguido de la SDS-PAGE tal y como se ha indicado en los Métodos.

#### 4. Resultados.

Para cada tipo celular los dos geles (sin y con TRH) se tiñeron con el colorante fluorescente ProQ, que solamente tiñe aquellas proteínas que tienen uno o más residuos fosforilados. Esta especificidad permite observar las variaciones tanto en la intensidad de fosforilación como en el cambio en la movilidad, dado que un aumento en la fosforilación de una proteína producirá un aumento en la señal y a la vez un desplazamiento hacia *pI* menores, es decir, hacia la izquierda en el gel. De este modo pudimos comparar los niveles de fosforilación en los múltiples *spots* o manchas en las muestras control y tratadas con TRH, con el fin de detectar diferencias entre ellas. Como se ilustra en la

Figura 56, también teñimos los geles con el colorante fluorescente de gran sensibilidad SYPRO, que se une tanto a proteínas fosforiladas como no fosforiladas. La comparación entre los *spots* observados en un gel mediante las tinciones ProQ y SYPRO proporciona una indicación de la proporción de la población de proteínas del gel que está fosforilada. Por otra parte, la aparición y desaparición de *spots* por los cambios en *pI* debidos a fosforilación deben observarse también en la tinción con SYPRO. Tras la comparación visual, los *spots* en los que se observaron diferencias de fosforilación fueron recortados y procesados para análisis mediante espectrometría de masas MALDI-ToF. Los datos obtenidos mediante la espectrometría de masas de cada muestra (huella peptídica) fueron comparados con la base de datos Swiss-Prot mediante el software MASCOT utilizando la opción de "*Peptide Mass Fingerprint*" (Matrix Science, <http://www.matrixscience.com>), con el fin de identificar a qué proteína correspondía cada mancha seleccionada por sus diferencias entre el gel control y el de TRH.

Usando esta metodología identificamos siete *spots* de células HEK-H36/T1 por sus diferencias entre el control sin tratar y el tratamiento con TRH, y doce *spots* de células GH<sub>3</sub>, estos procedentes de dos experimentos diferentes.



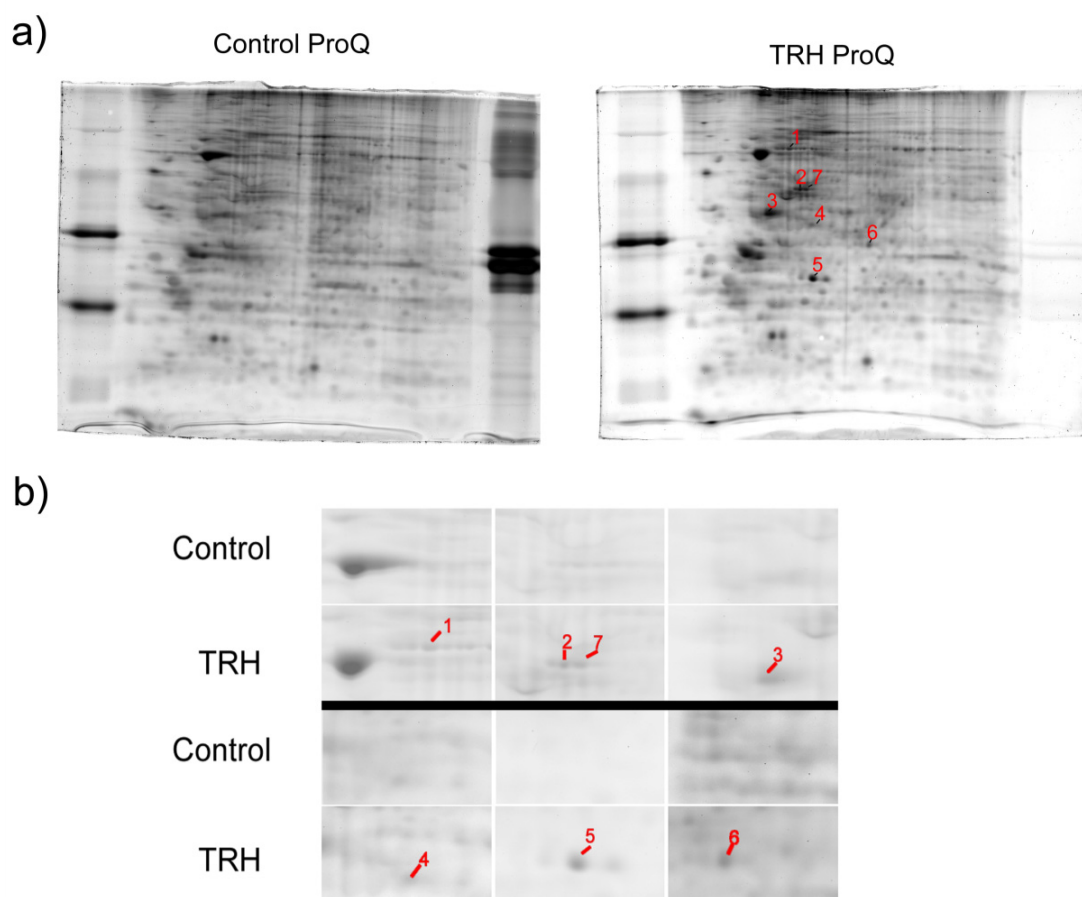
**Figura 56. Comparación de las tinciones utilizadas en el análisis bidimensional de la respuesta a TRH del fosfoproteoma de células HEK-H36/T1.** Electroforesis bidimensional de células HEK-H36/T1 control (arriba) y tratadas con TRH 1  $\mu$ M durante 5 min (abajo). Tras la segunda dimensión, las muestras se tiñeron con el colorante fluorescente fosfoespecífico ProQ, posteriormente se destiñeron y se procedió a la tinción con el colorante fluorescente SYPRO. Se indica el rango de pH no lineal (NL) utilizado para la primera dimensión de la electroforesis.

Como se puede ver en la

Figura 56, usando el colorante ProQ específico para proteínas fosforiladas se aprecian variaciones en el patrón de manchas entre células HEK-H36/T1 control y tratadas con TRH, indicando ciertos cambios en el fosfoproteoma de las células. Para intentar identificar las manchas que mostraban variación entre ambos geles, recortamos bajo luz ultravioleta los *spots* de interés de los geles. Los trozos de gel seleccionados fueron digeridos con tripsina y procesados para una posterior identificación mediante espectrometría de masas MALDI-ToF seguida de una identificación de la huella peptídica resultante usando MASCOT, para así identificar las proteínas en las cuales se observa variación en su estado de fosforilación en respuesta al tratamiento con TRH.



#### 4. Resultados.



**Figura 57. Cambios en el perfil fosfoproteico inducidos por TRH en células HEK-H36/T1.** a) geles bidimensionales teñidos con el colorante fosfoespecífico ProQ de células HEK-H36/T1 control o tratadas 5 min con TRH 1  $\mu$ M. Se indican las manchas que fueron seleccionadas para el posterior análisis mediante espectrometría de masas. b) Ampliación de las zonas del gel donde se encuentran las manchas seleccionadas procedentes de células tratadas con TRH comparadas con las mismas zonas de un gel de células control.

Como se muestra más detalladamente en la

Figura 57, que corresponde al experimento realizado con células HEK-H36T1 y el colorante fosfoespecífico ProQ, en las siete manchas en las que se observaron diferencias entre los geles de células control y tratadas con TRH se observa un aumento en la intensidad, lo cual sugiere en todos los casos un incremento de la fosforilación en respuesta a la la TRH. Desafortunadamente, los datos de espectrometría de masas MALDI-ToF obtenidos para estas siete manchas solo permitieron identificar de forma significativa dos de esas siete manchas, que corresponden a la cadena  $\alpha$ -1C de la tubulina y a la creatina kinasa tipo B (ver Tabla VI).

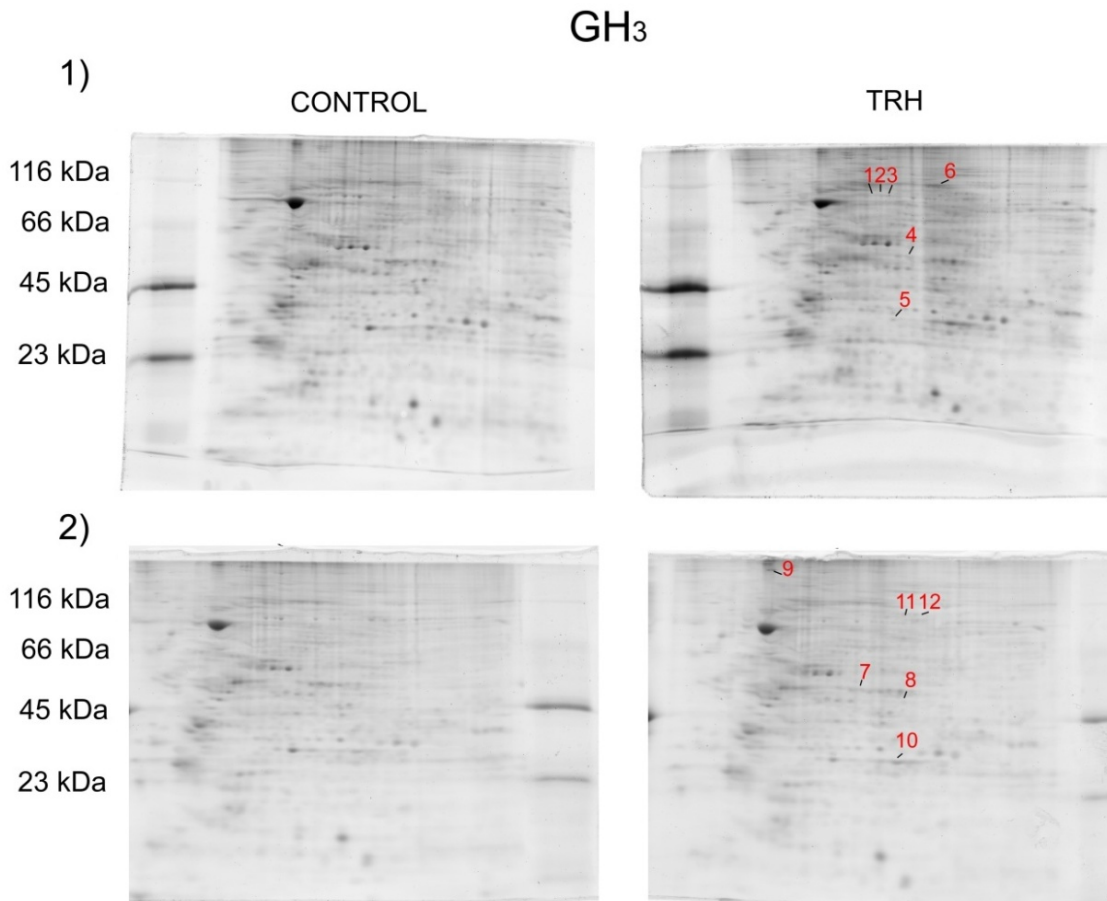
Spot	Proteína	Masa (Da)	Score	Expect	Matches	
1	HNRPM_HUMAN	77464	28	35	51	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M OS=Homo sapiens GN= HNRNPM PE=1 SV=3
2	G3BP1_HUMAN	52132	36	4.7	13	Ras GTPase-activating protein-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=G3BP1 PE=1 SV=1

3	TBA1C_HUMAN	49863	66	0.0057	12	Tubulin alpha-1C chain OS=Homo sapiens GN=TUBA1C PE=1 SV=1
4	KCRB_HUMAN	42617	90	2.3 e-05	18	Creatine kinase B-type OS=Homo sapiens GN=CKB PE=1 SV=1
5	AP3M2_HUMAN	46947	34	7.3	10	AP-3 complex subunit mu-2 OS=Homo sapiens GN=AP3M2 PE=1 SV=1
6	CLC4K_HUMAN	36702	33	11	7	C-type lectin domain family 4 member K OS=Homo sapiens GN=CD207 PE=1 SV=2
7	PRS7_HUMAN	48603	32	13	6	26S protease regulatory subunit 7 OS=Homo sapiens GN=PSMC2 PE=1 SV=3

**Tabla VI. Identificación por espectrometría de masas MALDI-ToF de los spots seleccionados mediante electroforesis bidimensional en células HEK-H36/T1 tratadas con TRH.** Se muestran los resultados de la identificación mediante MASCOT de la huella peptídica obtenida con la espectrometría de masas MALDI-ToF de las manchas seleccionadas. Se indica en cada columna el número de la mancha de la que se obtuvo la huella peptídica; la referencia de la proteína con mejor puntuación en la búsqueda de MASCOT en la base de datos de Swiss Prot; la masa en Da de dicha proteína; la puntuación o *score* de esa búsqueda, siendo significativas aquellas puntuaciones mayores de 56 para los parámetros seleccionados; probabilidad (*expect*) de que la identificación sea fruto del azar; el número de péptidos de la huella peptídica que están presentes en la secuencia de la proteína identificada (*matches*) y finalmente el nombre de la proteína, especie a la que pertenece (OS), nombre del gen que la codifica (GN), valor de evidencia de existencia de dicha proteína (PE, siendo 1 evidencia a nivel de proteína, 2 evidencia a nivel de transcrito, 3 inferida por homología y 4 predicción de su existencia) y número de versión a la que pertenece la secuencia (SV).

La realización de un análisis bidimensional de fosfoproteínas análogo al que acabamos de describir pero en células GH<sub>3</sub>, nos permitió observar diferencias en doce manchas entre las células control y las tratadas con TRH (Figura 58). Ocho de estas doce diferencias encontradas corresponden a una disminución (o práctica desaparición) en la intensidad de las manchas tras el tratamiento con TRH, sugiriendo que se deben a procesos de desfosforilación, mientras que las otras cuatro corresponden a un aumento en la intensidad (y en la fosforilación) inducido por el tratamiento hormonal. Lamentablemente, no conseguimos obtener una huella peptídica válida para tres de las doce manchas, y además sólo una de las nueve restantes fue identificada con valores significativos, siendo ésta la proteína ácida ribosomal 60S P0, en la cual se observa una disminución de la señal tras el tratamiento con TRH (Tabla VII).

#### 4. Resultados.



**Figura 58. Variación de la movilidad electroforética inducida por TRH en células GH<sub>3</sub>.** Geles bidimensionales de dos experimentos 1) y 2) de células GH<sub>3</sub> control o tratadas con TRH 1  $\mu$ M durante 5 min. Los geles se tiñeron con el colorante fosfoespecífico ProQ. Se indican las doce manchas que fueron seleccionadas para el posterior análisis mediante espectrometría de masas.

Aunque de forma parcial y preliminar, en conjunto estos datos sugieren que en las células HEK-H36/T1 la TRH promueve principalmente un aumento en la actividad de las proteína quinasas y los niveles de fosforilación, mientras que en células GH<sub>3</sub> el tratamiento con TRH parece aumentar la actividad de proteína fosfatasas, y, en menor medida, la de quinasas. En todo caso, parece claro que la hormona induce alguna(s) respuesta(s) diferente(s) en ambos tipos celulares.

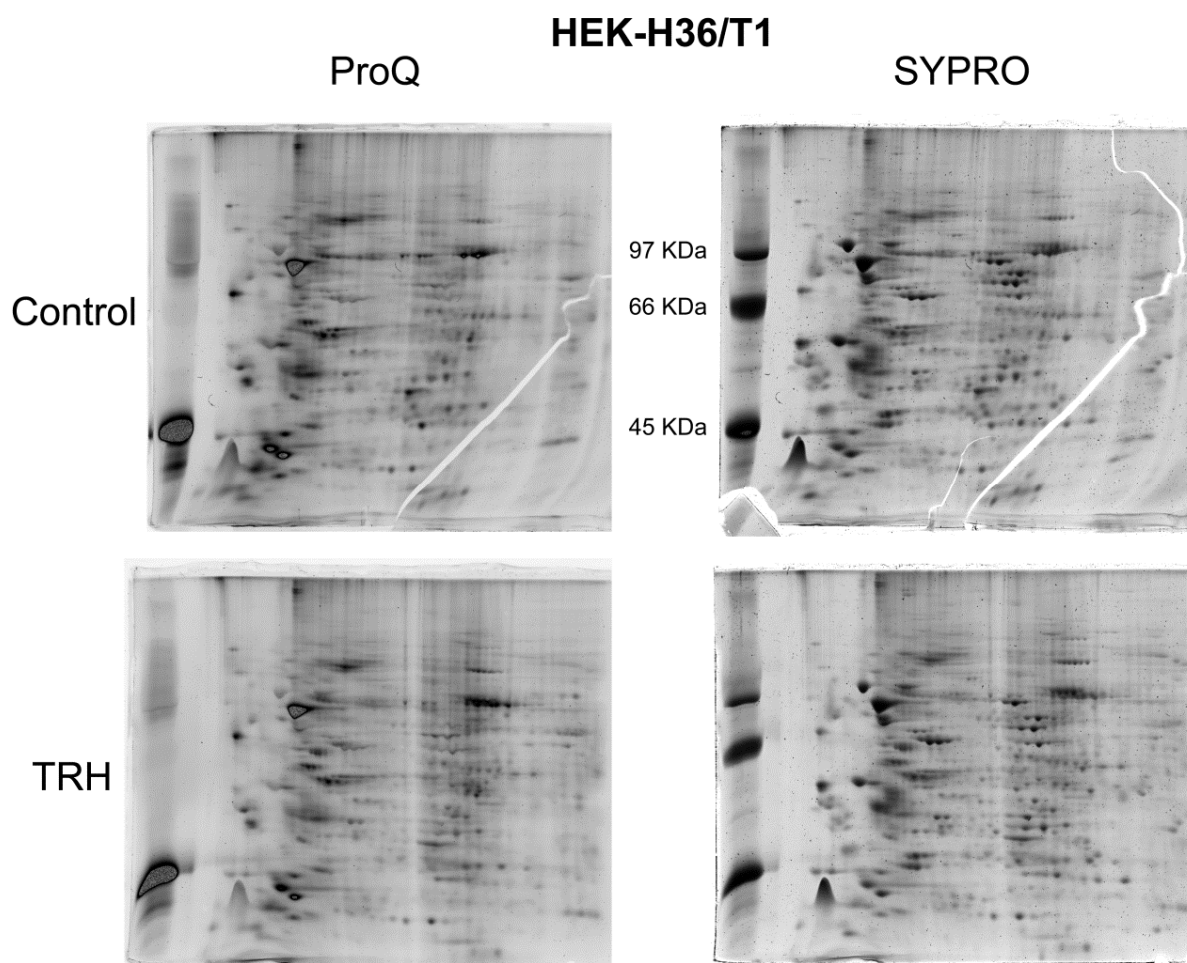
El abordaje experimental que acabamos de exponer produjo unos resultados relativamente pobres, ya que aunque observamos diferencias en el patrón electroforético entre las células control y tratadas con TRH en ambos tipos celulares, no conseguimos identificar una buena parte de las manchas seleccionadas. Por tanto, para tratar de mejorar el sistema experimental nos propusimos realizar un estudio del efecto de la TRH en el fosfoproteoma de las células, pero usando muestras enriquecidas en fosfoproteínas. Para ello los extractos obtenidos de células control y tratadas con TRH se sometieron a una cromatografía de afinidad

(Phosphoprotein Purification Kit, Qiagen), tal y como se describe en Métodos. Estos extractos enriquecidos en fosfoproteínas se usaron para realizar una electroforesis bidimensional de forma similar a los experimentos anteriores.

Spot	Proteína	Masa (Da)	Score	Expect	Matches	
1	KDM3A_RAT	135319	47	0.14	29	Lysine-specific demethylase 3A OS=Rattus norvegicus GN=Kdm3a PE=2 SV=1
2	PRS7_RAT	48544	49	0.098	17	26S protease regulatory subunit 7 OS=Rattus norvegicus GN=Psmc2 PE=1 SV=3
3	K1C10_RAT	56470	32	5.4	6	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Rattus norvegicus GN=Krt10 PE=2 SV=1
4	EF1G_RAT	50029	32	4.4	10	factor 1-gamma OS=Rattus norvegicus GN=Eef1g PE=1 SV=3
5	RLA0_RAT	34194	70	0.00086	12	60S acidic ribosomal protein P0 OS=Rattus norvegicus GN=Rplp0 PE=1 SV=2
6	ITPR1_RAT	313065	42	0.45	26	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 OS=Rattus norvegicus GN=Itpr1 PE=1 SV=2
7	THIM_RAT	41844	45	0.24	7	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Acaa2 PE=1 SV=1
8	EF1G_RAT	50029	30	7	6	Elongation factor 1-gamma OS=Rattus norvegicus GN=Eef1g PE=1 SV=3
10	SETD6_RAT	53328	37	1.5	7	N-lysine methyltransferase SETD6 OS=Rattus norvegicus GN=Setd6 PE=3 SV=1

**Tabla VII. Identificación por espectrometría de masas MALDI-ToF de los spots seleccionados mediante electroforesis bidimensional en células GH<sub>3</sub> tratadas con TRH.** Se muestran los resultados de la identificación mediante MASCOT de la huella peptídica obtenida con la espectrometría de masas MALDI-ToF de las manchas seleccionadas. Se indica en cada columna el número de la mancha de la que se obtuvo la huella peptídica; la referencia de la proteína con mejor puntuación en la búsqueda de MASCOT en la base de datos de Swiss Prot; la masa en Da de dicha proteína; la puntuación o *score* de esa búsqueda, siendo significativas aquellas puntuaciones mayores de 51 para los parámetros seleccionados; probabilidad (*expect*) de que la identificación sea fruto del azar; el número de péptidos de la huella peptídica que están presentes en la secuencia de la proteína identificada (*matches*) y finalmente el nombre de la proteína, especie a la que pertenece (OS), nombre del gen que la codifica (GN), valor de evidencia de existencia de dicha proteína (PE, siendo 1 evidencia a nivel de proteína, 2 evidencia a nivel de transcrito, 3 inferida por homología y 4 predicción de su existencia) y número de versión a la que pertenece la secuencia (SV).

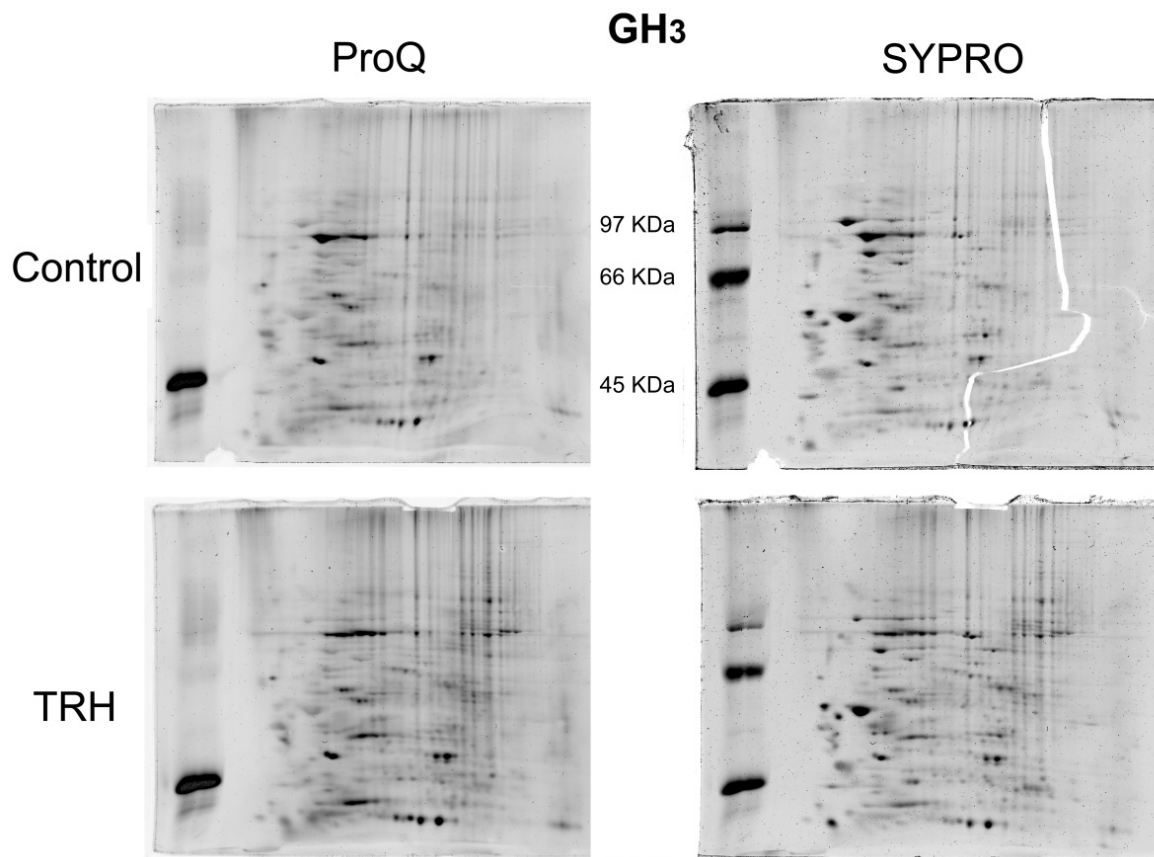
#### 4. Resultados.



**Figura 59. Análisis mediante electroforesis bidimensional de extractos de células HEK-H36/T1 enriquecidos en fosfoproteínas y de sus cambios en respuesta a TRH.** Se muestran geles correspondientes a células HEK-H36/T1 control (arriba) y tratadas con TRH 1  $\mu$ M 5 min (abajo). Tras la segunda dimensión, las muestras se tiñeron con el colorante fluorescente fosfoespecífico ProQ (izquierda). Posteriormente se destiñeron y se procedió a la tinción con el colorante fluorescente de proteínas SYPRO (derecha).

Como podemos apreciar en las

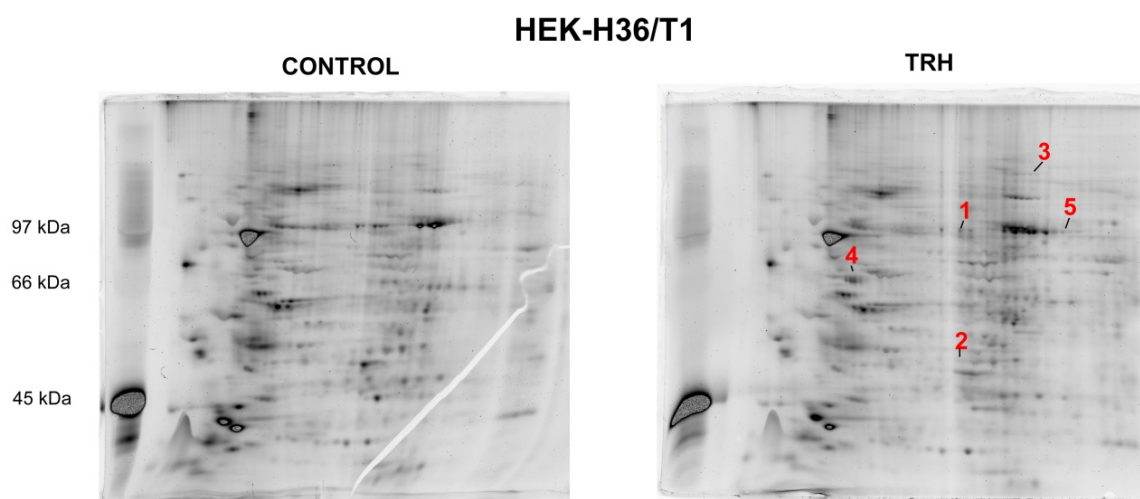
Figura 59 y Figura 60, tras el enriquecimiento en fosfoproteínas de los extractos de ambos tipos celulares, conseguimos incrementar la cantidad de proteínas detectadas con la tinción fosfoespecífica ProQ. De hecho, al comparar con la tinción SYPRO, comprobamos que la mayoría de las proteínas detectadas con esta tinción se detectaban también con la tinción fosfoespecífica. Por tanto, y como cabría esperar, la abundancia relativa de proteínas fosforiladas en estas muestras es mucho mayor que la observada en los extractos originales. Una vez comprobada la eficacia de la cromatografía de afinidad pasamos a estudiar los cambios en el fosfoproteoma de los dos tipos celulares en respuesta a TRH. Para ello de nuevo comparamos las manchas proteicas de los geles bidimensionales de las muestras control con las de los geles de las muestras de células tratadas con TRH.



**Figura 60.** Análisis mediante electroforesis bidimensional de extractos de células GH<sub>3</sub> enriquecidos en fosfoproteínas y de sus cambios en respuesta a TRH. Se muestran geles correspondientes a células GH<sub>3</sub> control (arriba) y tratadas con TRH 1  $\mu$ M 5 min (abajo). Tras la segunda dimensión, las muestras se tiñeron con el colorante fluorescente fosfoespecífico ProQ (izquierda). Posteriormente se destiñeron y se procedió a la tinción con el colorante fluorescente de proteínas SYPRO (derecha).

En las células HEK-H36/T1 observamos un aumento en la intensidad (y por tanto un aumento en sus niveles de fosforilación) de cuatro manchas proteicas (señaladas como 1, 2, 4 y 5 en la Figura 61) en respuesta al tratamiento con TRH y un desplazamiento hacia un pI mayor (por tanto reducción en la fosforilación) en una de las manchas (la señalada con un 3 en la Figura 61). Estas cinco manchas fueron recortadas y procesadas para su análisis mediante espectrometría de masas MALDI-ToF y se trataron de identificar mediante la comparación de sus huellas peptídicas con las bases de datos Swiss-Prot, utilizando para ello el software MASCOT mediante una búsqueda *Peptide Mass Fingerprint* (Matrix Science). Desgraciadamente de nuevo en ninguno de los casos conseguimos una identificación estadísticamente significativa de tales huellas peptídicas (Tabla VIII).

#### 4. Resultados.



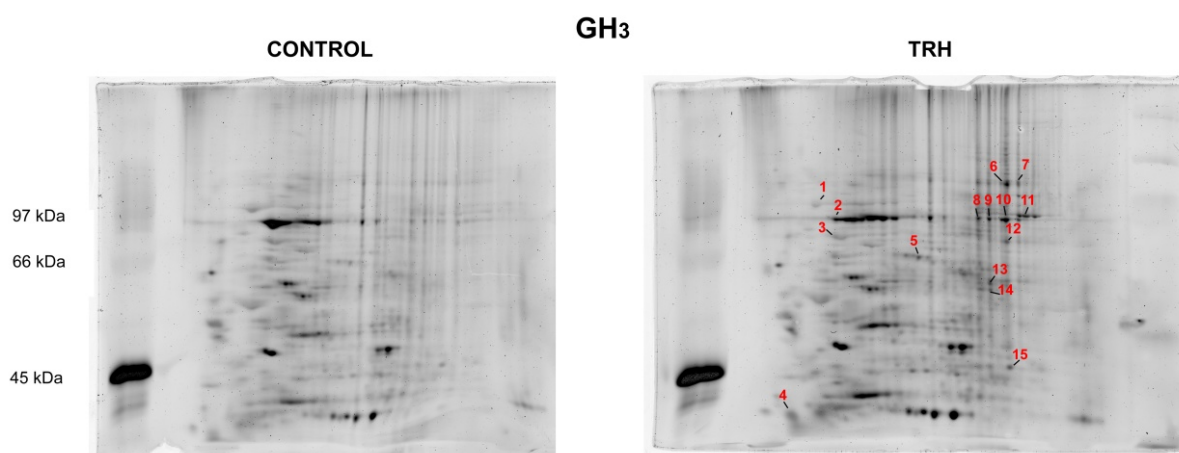
**Figura 61. Identificación de fosfoproteínas que sufren cambios en células HEK-H36/T1 tratadas con TRH.** Se muestran los dos geles (control y TRH) de extractos enriquecidos en fosfoproteínas de células HEK-H36/T1 teñidos con el colorante fosfoespecífico ProQ y tratadas con TRH 1  $\mu$ M 5 min. Se indican las manchas que fueron seleccionadas para el posterior análisis mediante espectrometría de masas.

Spot	Proteína	Masa (Da)	Score	Expect	Matches	
1	AACT_HUMAN	47621	39	2.3	6	Alpha-1-antichymotrypsin OS=Homo sapiens GN=SERPINA3 PE=1 SV=2
2	PNMA1_HUMAN	39736	40	1.8	6	Paraneoplastic antigen Ma1 OS=Homo sapiens GN=PNMA1 PE=1 SV=2
4	PLSL_HUMAN	70244	38	2.9	11	Plastin-2 OS=Homo sapiens GN=LCP1 PE=1 SV=6
5	HTRB1_HUMAN	193051	43	0.95	12	HEAT repeat-containing protein 7B1 OS=Homo sapiens GN=HEATR7B1 PE=4 SV=3

**Tabla VIII. Identificación por espectrometría de masas MALDI-ToF de los spots que mostraban cambios en respuesta a la TRH en los extractos enriquecidos en fosfoproteínas de células HEK-H36/T1.** Se muestran los resultados de la identificación mediante MASCOT de la huella peptídica obtenida con la espectrometría de masas MALDI-ToF de las manchas observadas en un gel bidimensional de extractos de células HEK-H36/T1 enriquecidos en fosfoproteínas y teñido con el colorante fosfoespecífico ProQ. Ver Tabla VI.

Por su parte, en el análisis electroforético bidimensional de los extractos de células GH<sub>3</sub> enriquecidos en proteínas fosforiladas observamos cambios en la movilidad electroforética de quince manchas proteicas entre las células control y las tratadas con TRH, de las cuales tres disminuían en intensidad tras el tratamiento con TRH (las señaladas como 1, 2 y 3 en la Figura 62) y las otras doce aumentaban de intensidad tras el tratamiento con TRH (manchas 4 a 15 en la Figura 62). Estas quince manchas fueron recortadas y procesadas para su análisis mediante espectrometría de masas MALDI-ToF y para su identificación como en el caso anterior. De las tres manchas que disminuyen tras el tratamiento con TRH, identificamos la 2 y la 3, que corresponden a las proteínas HS90B (*Heat Shock Protein 90 beta*) y GRP78 (*78kDa Glucose regulated protein, o Heat shock 70 kDa protein 5*) respectivamente. Respecto a las otras doce en las que el nivel de fosforilación aumentaba tras el tratamiento con TRH, sólo conseguimos

una identificación estadísticamente significativa de la mancha 5, que corresponde a la DPYL2 (10 Dihydropyrimidinase-related protein 2) (Tabla IX).



**Figura 62. Identificación de fosfoproteínas que sufren cambios en células GH<sub>3</sub> tratadas con TRH.** Se muestran los dos geles (control y TRH) de extractos enriquecidos en fosfoproteínas y teñidos con el colorante fosfoespecífico ProQ con o sin tratamiento con TRH 1  $\mu$ M 5 min. Se indican las manchas que fueron seleccionadas para el posterior análisis mediante espectrometría de masas.

Spot	Proteína	Masa (Da)	Score	Expect	Matches	
1	PRS23_RAT	43132	36	2.1	8	Serine protease 23 OS=Rattus norvegicus GN=Prss23 PE=2 SV=1
2	HS90B_RAT	83229	57	0.016	19	Heat shock protein HSP 90-beta OS=Rattus norvegicus GN=Hsp90ab1 PE=1 SV=4
3	GRP78_RAT	72302	88	1.1e-05	17	78 kDa glucose-regulated protein OS=Rattus norvegicus GN=Hspa5 PE=1 SV=1
4	JAM1_RAT	32349	37	1.6	6	Junctional adhesion molecule A OS=Rattus norvegicus GN=F11r PE=1 SV=1
5	DPYL2_RAT	62239	58	0.012	10	Dihydropyrimidinase-related protein 2 OS=Rattus norvegicus GN=Dpysl2 PE=1 SV=1
6	CP2J3_RAT	57932	34	3.1	8	Cytochrome P450 2J3 OS=Rattus norvegicus GN=Cyp2j3 PE=2 SV=1
7	GRAB_RAT	27308	33	3.8	5	Granzyme B OS=Rattus norvegicus GN=Gzmb PE=1 SV=1
8	CNN1_RAT	33323	40	0.86	11	Calponin-1 OS=Rattus norvegicus GN=Cnn1 PE=2 SV=1
9	TRPC1_RAT	87561	30	7.7	11	Short transient receptor potential channel 1 OS=Rattus norvegicus GN=Trpc1 PE=1 SV=1
10	OPHN1_RAT	91781	28	13	11	Oligophrenin-1 OS=Rattus norvegicus GN=Ophn1 PE=1 SV=1
11	K1C13_RAT	47699	41	0.58	10	Keratin, type I cytoskeletal 13 OS=Rattus norvegicus GN=Krt13 PE=2 SV=1
12	TRPC1_RAT	87561	33	3.7	13	Short transient receptor potential channel 1 OS=Rattus norvegicus GN=Trpc1 PE=1 SV=1
13	AGT2_RAT	57164	30	7.1	8	Alanine-glyoxylate aminotransferase 2, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Agxt2 PE=1 SV=2
14	ENC2_RAT	65798	32	5.3	14	Ectoderm-neural cortex protein 2 OS=Rattus norvegicus GN=Klh25 PE=2 SV=1
15	TRI11_RAT	52520	34	3.2	6	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM11 OS=Rattus norvegicus GN=Trim11 PE=2 SV=1

**Tabla IX. Identificación por espectrometría de masas MALDI-ToF de los spots que mostraban cambios en respuesta a la TRH en los extractos enriquecidos en fosfoproteínas de células GH<sub>3</sub>.** Se muestran los resultados de la identificación mediante MASCOT de la huella peptídica obtenida con la espectrometría de masas MALDI-ToF



#### 4. Resultados.

de las manchas observadas en un gel bidimensional de extractos enriquecidos en fosfoproteínas y teñido con el colorante fosfoespecífico ProQ. Ver Tabla VII.

En resumen, al haber enriquecido las muestras en proteínas fosforiladas, hemos podido identificar un mayor número de proteínas cuyo estado de fosforilación cambia en respuesta a TRH. Sin embargo nuestro sistema de identificación de estas proteínas produjo unos resultados muy limitados, al haberse conseguido identificar un porcentaje muy bajo de las manchas proteicas analizadas. Así, juntando los experimentos realizados con extractos celulares totales y fosfoenriquecidos de células HEK-H36/T1, pudimos detectar cambios en la fosforilación de doce proteínas, de las que once correspondían a aumentos en los niveles de fosforilación tras la TRH y la otra a una disminución. Sin embargo, de estas doce proteínas estudiadas, sólo se identificaron dos, en las que los niveles de fosforilación habían aumentado tras el tratamiento hormonal: la Tubulina alfa 1C y la Creatina Quinasa tipo B (Tabla X).

En cuanto a las células GH<sub>3</sub>, encontramos diferencias entre los gels de extractos (totales o fosfoenriquecidos) de células control y tratadas con TRH en veintisiete manchas, de las cuales dieciséis tenían sus niveles de fosforilación aumentados en células tratadas con TRH y once los tenían disminuídos. Como se muestra en la Tabla X, solo conseguimos identificar cuatro de esas manchas, en tres de las cuales había una disminución de la fosforilación tras el tratamiento hormonal (proteína ácida ribosomal 60S P0, HS90B o *Heat Shock Protein 90 beta*, y GRP78 ó *78KDa Glucose regulated protein*), y en la otra un aumento (DPYL2 ó *10 Dihydropyrimidinase-related protein 2*).

##### a) Proteínas identificadas a partir de células HEK-H36/T1

Fosforilación	Proteína	Masa (Da)	Score	Expect	Matches	
↑	TBA1C_HUMAN	49863	66	0.0057	12	Tubulin alpha-1C chain OS=Homo sapiens GN=TUBA1C PE=1 SV=1
↑	KCRB_HUMAN	42617	90	2.3 e-05	18	Creatine kinase B-type OS=Homo sapiens GN=CKB PE=1 SV=1

##### b) Proteínas identificadas a partir de células GH<sub>3</sub>

Fosforilación	Proteína	Masa (Da)	Score	Expect	Matches	
↓	RLA0_RAT	34194	70	0.00086	12	60S acidic ribosomal protein P0 OS=Rattus norvegicus GN=Rplp0 PE=1 SV=2
↓	HS90B_RAT	83229	57	0.016	19	Heat shock protein HSP 90-beta OS=Rattus norvegicus GN=Hsp90ab1 PE=1 SV=4
↓	GRP78_RAT	72302	88	1.1e-05	17	78 kDa glucose-regulated protein OS=Rattus norvegicus GN=Hspa5 PE=1 SV=1
↑	DPYL2_RAT	62239	58	0.012	10	Dihydropyrimidinase-related protein 2 OS=Rattus norvegicus GN=Dpysl2 PE=1 SV=1

**Tabla X. Proteínas identificadas de forma estadísticamente significativa cuyo estado de fosforilación varía al tratar con TRH células HEK-H36/T1 y GH<sub>3</sub>.** Se muestran los resultados de la identificación mediante MASCOT

de la huella peptídica obtenida con la espectrometría de masas MALDI-ToF de las manchas observadas en un gel bidimensional de extractos de células HEK-H36/T1 (a) y GH<sub>3</sub> (b).

### 4.3.2. Análisis mediante fosfoproteómica cuantitativa de los cambios en fosforilación en respuesta a TRH.

Debido a los pobres resultados obtenidos con la identificación de *spots* proteicos mediante MALDI-ToF, contactamos con el grupo del Dr. Pedro Cutillas en el Barts Cancer Research de la Queen Mary University of London, para realizar los estudios de acción de la TRH mediante técnicas de fosfoproteómica cuantitativa, que parten de mezclas de fosfopéptidos enriquecidos por cromatografía de afinidad a partir de mezclas de péptidos trípticos totales obtenidos de extractos celulares. Estas mezclas de fosfopéptidos son analizadas mediante espectrometría de masas cuantitativa LC-MS/MS, y los datos son cuantificados mediante un análisis bioinformático (Cutillas y Vanhaesebroeck 2007; Casado y Cutillas 2011; Montoya *et al.* 2011; Beltrán y Cutillas 2012)

Con esta novedosa metodología decidimos estudiar los fosfoproteomas de las células GH<sub>3</sub> y HEK-H36/T1 y cómo variaban en respuesta a la TRH. Para ello se recogieron de placas triplicadas células control y tratadas con TRH 1  $\mu$ M durante 5 min, y se procedió a una digestión tríptica de los extractos seguida de una purificación de los fosfopéptidos mediante cromatografía de afinidad con TiO<sub>2</sub>. Los fosfopéptidos así obtenidos se separaron en una cromatografía de fase reversa en columnas C18 (ver Métodos), y las fracciones de la misma se sometieron a espectrometría de masas (LC-MS/MS). Los datos resultantes fueron procesados usando Mascot Daemon (<http://www.matrixscience.com/daemon.html>) y se realizó un análisis estadístico de los resultados mediante el PESCAL (*Peak Statistic Calculator*; Cutillas y Vanhaesebroeck 2007), tomando como estadísticamente significativas aquellas variaciones en los niveles de fosforilación entre control y TRH que suponían un incremento o disminución superior a dos veces (incremento  $> 2$  ó  $< 0,5$  respectivamente) y con un p-valor  $< 0,05$ .

Utilizando esta metodología en tres experimentos por triplicado, conseguimos identificar 2494 fosfopéptidos diferentes en las células HEK-H36/T1, de los cuales 308, correspondientes a 261 proteínas distintas, tenían unos niveles de fosforilación significativos (con un p-valor  $< 0,05$ ). De estos fosfopéptidos con valores significativos, en 183 casos se observaban variaciones en sus niveles de fosforilación en respuesta a la TRH, con incrementos en fosforilación (*fold*  $> 2$ ) tras el tratamiento hormonal en 107 fosfopéptidos de 93 proteínas diferentes, y decrementos en fosforilación (*fold*  $< 0,5$ ) en 76 fosfopéptidos de 72 proteínas distintas (Tabla XI). En el caso de las células GH<sub>3</sub>, también realizamos tres experimentos por

#### 4. Resultados.

triplicado y gracias a ellos se identificaron 1463 fosfopéptidos, con niveles de fosforilación significativos (con un p-valor < 0,05) en 126 de ellos, correspondientes a 98 proteínas distintas. De éstos, 88 presentaban variaciones en sus niveles de fosforilación tras el tratamiento con TRH, estando ésta incrementada en 27 fosfopéptidos de 25 proteínas y disminuída en 61 fosfopéptidos de 50 proteínas (Tabla XII).

Estos datos indican que, a nivel global, hay claras diferencias entre las respuestas a nivel de fosforilación producidas por la TRH en ambos tipos celulares. El hecho de que con células HEK-H36/T1 se identifique un mayor número de péptidos y se obtenga un mayor porcentaje de valores de fosforilación estadísticamente significativos respecto a los obtenidos con células GH<sub>3</sub>, puede explicarse por la presencia de una mayor cantidad de proteínas en la muestra inicial de células HEK-H36/T1, lo que produce una mayor intensidad en las señales de los fosfopéptidos detectadas por espectrometría de masas. Por otro lado, son evidentes las diferencias en cuanto a porcentajes de fosforilación y desfosforilación en la respuesta a TRH de los dos tipos celulares. De las 261 proteínas de células HEK-H36/T1 con unos valores de fosforilación estadísticamente significativos, el 35,6 % tenían una fosforilación incrementada y el 27,6 % disminuida en respuesta a TRH, mientras que en las células GH<sub>3</sub>, de las 98 proteínas con valores de fosforilación estadísticamente significativos, el 25,5 % presentaban aumentos de fosforilación y el 51,0 % disminuciones en respuesta a TRH. Estos porcentajes son asimilables a los experimentos de análisis por electroforesis bidimensional de ambos tipos celulares, en los cuales habíamos observado de forma general que el tratamiento de las células con TRH producía una mayor tendencia al aumento de las fosforilaciones en HEK-H36/T1 y una mayor tendencia a la disminución de las fosforilaciones en GH<sub>3</sub>.

Entre las proteínas que varían en respuesta a la TRH en las células HEK-H36/T1, observamos varias responsables directas de procesos de fosforilación, es decir, proteína quinasas o fosfatasa. Algunas de ellas presentan un notable aumento en sus niveles de fosforilación tras el tratamiento, como la MAPK1/ERK2 (con un aumento de la fosforilación de 37,08 veces), la MAPK3/ERK1 (con aumentos de 19,42 y 18,74 veces), la p90RSK1 (aumento de 18,85 veces), la CDK12 (aumento de 3,84 veces) y la tirosina fosfatasa PTPN2 (aumento de 2,5 veces; ver Tabla XI a). Otras mostraron disminución en su estado de fosforilación en respuesta a la TRH, como la MAP3K2 (con una fosforilación respecto al control de 0,42 veces), la ABL2 (0,32 veces) y la PI4KA (0,016 veces; ver Tabla XI a). También se detectó un notable aumento en el nivel de fosforilación de varias proteínas activadoras de GTPasas, como la *ARF GTPase-activating protein* GIT1 con un aumento de la fosforilación de 26,8 veces, la *Ras GTPase-*

*activating-like protein* IQGAP2 con 18,82 veces y la *Ran-specific GTPase-activating protein* RANBP1 con 4,72 veces (Tabla XI b). Son especialmente de destacar los cambios observados en los niveles de fosforilación de la serina 1137 del canal hERG, con un incremento en los niveles del fosfopéptido de 18,37 veces, que parecen indicar que hay una fosforilación directa de la proteína del canal en respuesta a la TRH (Tabla XI b).

En cuanto a las proteínas cuya fosforilación varía en células GH<sub>3</sub>, se encontraron con ésta aumentada tras el tratamiento con TRH las proteína quinasas MAPK3/ERK1 (15,96 veces de incremento), MAPK1/ERK2 (14,65 veces) y PRKD1 (3,65 veces), además de la proteína fosfatasa Sinaptojanina con un incremento de 2,24 veces (Tabla XII a). Por otro lado, presentaron una fosforilación disminuída tras el tratamiento con TRH las quinasas MARK 2 (con 0,49 veces de fosforilación respecto del control), CDK9 (con 0,47), PI4K2A (con 0,44), PRPF4b (con 0,44, 0,4 y 0,38), PAK1 (con 0,32) y EEF2K (con 0,26; ver Tabla XII a). Otras proteínas cuya variación en su estado de fosforilación en respuesta a la TRH es interesante son la Intersectina 1, con un aumento de 33,4 veces y el Arhgef7, con una disminución de 0,45 veces (Tabla XII b).

En el apartado c de las Tabla XI y Tabla XII hemos incluido aquellas proteínas de células HEK-H36/T1 y GH<sub>3</sub> respectivamente, cuyos niveles de fosforilación sufren cambios en ambos tipos celulares. Es notable que de entre todas las proteínas en las que se detectó variación en sus niveles de fosforilación, 183 en células HEK-H36/T1 y 88 en células GH<sub>3</sub>, solo 19 fueran comunes a los dos tipos celulares (Tabla XIII). Es importante señalar además que los cambios en la fosforilación de estas 19 proteínas no siempre se dan en el mismo sentido, sino que 5 de ellas presentan una fosforilación aumentada en ambos tipos celulares (ERK1, ERK2, MARCS, EF1D y IWS1), en otras 5 hay una disminución de la fosforilación en las dos líneas celulares (NMT1, AGFG1, MBB1A, HIVEP2 y MAP1S) y en las 9 proteínas restantes se produce una respuesta diferente según el tipo celular, incrementándose la fosforilación en HEK-H36/T1 y disminuyendo en GH<sub>3</sub> en 7 de ellas (STMN1, SPTA2, MAP1B, ZC3H18, TAU, THRAP3 y ARHGEF2) mientras que ocurre lo contrario en otras 2 (MRP y APC) (Tabla XIII). Esta última observación coincide con las diferencias de respuesta global en los dos tipos celulares mencionadas anteriormente. Es especialmente interesante el caso de ERK1 y ERK2, las cuales son intensamente fosforiladas en respuesta a la TRH en los residuos del motivo TEY responsables de su activación (Robbins *et al.* 1993; Cargnello y Roux 2011). Esta notable activación de ERK1/2 que ya había sido descrita anteriormente (Omichi *et al.* 1994; Palomero *et al.* 1998; Kanasaki *et al.* 1999) concuerda con los datos de análisis western expuestos previamente (Figura 42). También se observa una fosforilación en ambos tipos celulares en la proteína MARCKS, un

#### 4. Resultados.

sustrato de PKC cuya fosforilación en respuesta a TRH ha sido previamente descrita en células GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub> (Akita *et al.* 2000).

Nombre	Descripción	Ref Seq	Gen	Secuencia peptídica	Fosfositio	Variación
<b>a. Proteínas quinasas y fosfatasa</b>						
Mitogen-activated protein kinase 1	Quinasa	NP_002736.3	MAPK1	VADPDHDHTGFLT*EY*VATR	T185, Y187	37.08
Mitogen-activated protein kinase3	Quinasa	NP_001035145.1	MAPK3	IADPEHDHTGFLT*EYVATR	T202	19.42
				IADPEHDHTGFLTEY*VATR	Y204	18.74
Ribosomal protein S6 kinase alpha-1	Quinasa	NP_001006666.1	RPS6KA1	KLPST*TL	T733	18.85
Cell division protein kinase 12	Quinasa	NP_055898.1	CDK12	HLLTDLPLPPELPGGDLS*PPD S*PEPK	S681, S685	3.84
Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 2	Fosfatasa	NP_002819.2	PTPN2	EDLS*PAFDHSPNK	S298	2.5
Mitogen-activated protein kinase kinase 2	Quinasa	NP_006600.3	MAP3K2	DRS*SPPPGYIPDELHQVAR	S163	0.42
Tyrosine-protein kinase ABL2ABL2	Quinasa	NP_001129472.1	ABL2	GAQASS*GSPALPR	S618	0.32
Phosphatidylinositol 4-kinase alpha	Quinasa	NP_002641.1	PI4KA	FPVVVHS*VT*PSLR	S444, T446	0.02
<b>b. Otras proteínas de transducción de señales o de interés.</b>						
Stathmin	Citoesqueleto	NP_001138926.1	STMN1	AS*GQAFELILS*PR AS*GQAFELILSPR RAS*GQAFELILSPR RAS*GQAFELILSPR AS*GQAFELILSPR	S16, S25 S16 S16 S16 S16	53.51 3.84 3.19 4.38 3.68
1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase eta-1	Enzima	NP_001124432.1	PLCH1	MADLEVY*KNLSPEK	Y7	27.17
ARF GTPase-activating protein GIT1	activadora GTPasas	NP_001078923.1	GIT1	SLSS*PTDNLELSLR	S362	26.8
1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-3	Enzima	NP_000923.1	PLCB3	S*LGDEGLNR	S537	25.51
Ras GTPase-activating-like protein IQGAP2	activadora GTPasas	NP_006624.2	IQGAP2	YGS*IVDDER	S16	18.82
Potassium voltage-gated channel subfamily H member 2	Canal iónico	NP_000229.1	KCNH2	RLS*LPGQLGALTSQPLHR RALVGP GS*PPR RLS*LPGQLGALTSQPLHR	S1137 S239 S1137	18.37 4.43 0.46
Ran-specific GTPase-activating protein A-kinase anchor protein 8	Otros	NP_002873.1	RANBP1	FAS*ENDLPEWK	S60	4.72
A-kinase anchor protein 2	Otros	NP_005849.1	AKAP8	VDS*EGDFS*ENDDAAGDFR	S323,S328	3.91
Kinase D-interacting substrate of 220 kDa	Otros	NP_001004065.2	AKAP2	DALGDSLQVPS*PSSTSSR	S152	2.02
Phosphatase and actin regulator 2	Regulador de la transcripción	NP_065789.1	KIDINS22	NFEVFLS*SR	S1033	0.38
	Otros	NP_001093634.1	PHACTR2	ASIANSDGPTAGSQT*PPFK	T25	0.32
<b>c. Proteínas en las que aumenta o disminuye la fosforilación en células HEK-H36/T1 y GH<sub>3</sub>.</b>						
Mitogen-activated protein kinase 1	Quinasa	NP_002736.3	MAPK1	VADPDHDHTGFLT*EY*VATR	T185, Y187	37.08
Mitogen-activated protein kinase3	Quinasa	NP_001035145.1	MAPK3	IADPEHDHTGFLT*EYVATR	T202	19.42
				IADPEHDHTGFLTEY*VATR	Y204	18.74
Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	Otros	NP_002347.5	MARCKS	EAPAEGEAAEPGS*PTAAEGE AASAASSTSSPK	S118	2.2
Elongation factor 1-delta	Regulador de la transcripción	NP_001123525.2	EEF1D	KPAT*PAEDDEDLDFLFGS*D NEEEDKEAAQLR	T147, S162	2.16
Protein IWS1 homolog	Enzima	NP_060439.2	IWS1	HQAS*DS*ENEELPKPR	S235, S237	1.92
Arf-GAP domain and FG repeats-containing protein 1	Otros	NP_001128660.1	AGFG1	GT*PSQS*PVVGR	T177, S181	0.41
Transcription factor HIVEP2	Regulador de la transcripción	NP_006725.3	HIVEP2	RDLS*PR	S2130	0.35
Microtubule-associated protein 1S	Enzima	NP_060644.4	MAP1S	SAS*PHDVDLCLVSPCEFEHR	S731	0.25

**Tabla XI. Proteínas de interés que sufren cambios en fosforilación en células HEK-H36/T1 tratadas con TRH.** Se muestra una selección de las proteínas más relevantes con niveles de fosforilación significativamente distintos en células HEK-H36/T1 control y tratadas con TRH 1  $\mu$ M 5 min, identificadas mediante espectrometría de masas cuantitativa. Para una mejor presentación de los datos se han separado en tres grupos según sus características, y algunas aparecen en más de un grupo. Se indica en cada caso el nombre de la proteína, su función o tipo, el número de acceso en GenBank, el nombre del gen que codifica la proteína, el fosfopéptido detectado en mediante espectrometría de masas (se indica con un asterisco el residuo fosforilado), la posición del residuo o residuos fosforilados en la secuencia de la proteína, y las veces (*fold*) de variación relativa en fosforilación tras el tratamiento con TRH. Solo se indican aquellas proteínas con una variación  $> 2$  ó  $< 0,5$ .

Nombre	Descripción	Ref Seq	Gen	Secuencia peptídica	Fosfositio	Variación
<b>a. Proteínas quinasas y fosfatasa</b>						
Mitogen-activated protein kinase 3	Quinasa	NP_059043.1.	Mapk3	IADPEHDHTGFLT*EY*VATR	T203, Y205	15.97
Mitogen-activated protein kinase 1	Quinasa	NP_446294.1.	Mapk1	VADPDHDHTGFLT*EY*VATR	T183, Y185	14.66
Serine/threonine-protein kinase D1	Quinasa	XP_001078506.1.	Prkd1	RLS*NVS*LTGLGTVR	S203, S206	3.65
Synaptojanin-1	Fosfatasa	NP_445928.2.	Synj1	TS*PCQS*PTAPEYSAPSLPIRPSR	S1049, S1053	2.24
Serine/threonine-protein kinase MARK2	Quinasa	NP_067731.1.	Mark2	VPAS*PLPLGDR	S453	0.49
Cell division protein kinase 9	Quinasa	NP_001007744.1.	Cdk9	KGS*QITQQSTNQSR	S347	0.47
Phosphatidylinositol 4-kinase type 2-alpha	Quinasa	NP_446187.1.	Pi4k2a	VAAAGSGPS*PPCSPGHDR	S46	0.44
Serine/threonine-protein kinase PRP4 homolog	Quinasa	NP_001011923.1.	Prpf4b	LCDFGSASHVADNDITPYLV*S*	S852	0.44
				LCDFGSASHVADNDITPY*LVSR	Y849	0.44
				RLSS*PR	S411	0.40
				KKS*PIVNER	S278	0.38
Serine/threonine-protein kinase PAK 1	Quinasa	NP_058894.1.	Pak1	TVSETPAVPPVS*EDEDDDDDAT	s174	0.32
				PPPVIAPRPEHTK		
Eukaryotic elongation factor 2 kinase	Quinasa	NP_037079.1.	Eef2k	TECGSTGS*PASSFHFK	s73	0.26
<b>b. Otras proteínas de transucción de señales o de interés.</b>						
Intersectin 1	Otros	NP_062100.1	Itsn1	STS*IDTGPTEAPSSLK	S975	33.4
Prostaglandin E synthase 3	Otros	NP_001124461.1.	Ptges3	FSEMMDHMGDEDVDLPEVDG	S151	17.56
				ADDDSQDS*DDEKMPDLE		
				LNWLSVDFNWKDWEDDS*DE	S113	0.32
				DMSNFDR		
Hepatocyte growth factor	Factor de crecimiento	NP_058713.1.	Hgf	NCIIGKGG*S*YKGT*VSITK	S136, T140	3.57
Stathmin	Otros	NP_058862.1.	Stmn1	S*HEAEVLK	S63	0.46
				SKESVPEFPLS*PPK	S38	0.28
Rho guanine nucleotide exchange factor 7	Otros	NP_001106994.1.	Arhgef7	KPS*DEEFAVR	S516	0.45
Thyroid hormone receptor-associated protein 3	Regulador de la transcripción	NP_001009693.1.	Thrap3	ERS*PALK	S248	0.42
Nitric oxide synthase, brain	Enzima	NP_434686.1.	Nos1	KSS*GDGPDLR	S858	0.37
Inositol-3-phosphate synthase 1	Enzima	NP_001013902.2.	Isyna1	ATS*PLPCKK	S524	0.22
<b>c. Proteínas en las que aumenta o disminuye la fosforilación en células GH<sub>3</sub> y HEK-H36/T1.</b>						
Mitogen-activated protein kinase 3	Quinasa	NP_059043.1.	Mapk3	IADPEHDHTGFLT*EY*VATR	T203, Y205	15.97
Mitogen-activated protein kinase 1	Quinasa	NP_446294.1.	Mapk1	VADPDHDHTGFLT*EY*VATR	T183, Y185	14.66
Elongation factor 1-delta Eef1d	Factor de elongación	NP_001013122.1	Eef1d	GATPAEDEDNDIDLFGS*DEEE	S162	3.51
				EDK		
				ATAPQTQHVS*PMR	S133	0.29
Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	Otros	XM_002728965.2	Marcks	LSGFS*FKK	S163	2.6
				GAAAERPGEA AVASS*PSKANG	S27	0.49
				QENGHVK		
				AEDGAAPSPSSET*PKK	T143	0.42
				GAAAERPGEA AVASS*PSKANG	S27	0.33
				QENGHVK		
Protein IWS1 homolog	Factor de transcripción	NP_001030090.1.	lws1	AAVLS*DS*EDEDKASAAK	S342, S344	2.34
Arf-GAP domain and FG repeats-containing protein 1	Transporte RNA	NP_001129068.1.	Agfg1	SLLGESAPALHLNKGTP*QS*PV	T179, S181	0.45
				VGR		
Microtubule-associated protein 1S	Unión tubulina	NP_001099540.1.	Map1s	KAPARPSS*ASAAPR	S785	0.34
				KAPARPSS*ASAAPR	S785	0.29
Human immunodeficiency virus type 1 enhancer-binding protein 2 homolog	Regulador de la transcripción	NP_077051.1.	Hivep2	RDLS*PR	S2121	0.26

**Tabla XII. Proteínas de interés que sufren cambios en fosforilación en células GH<sub>3</sub> tratadas con TRH.** Se muestran una selección de las proteínas más relevantes con niveles de fosforilación significativamente distintos, identificadas mediante espectrometría de masas cuantitativa en células GH<sub>3</sub> control y tratadas con TRH 1  $\mu$ M 5 min. Para una mejor presentación de los datos se han separado en tres grupos según sus características, y algunas aparecen en más de un grupo. Se indica en cada caso el nombre de la proteína, su función o tipo, el número de acceso en GenBank, el nombre del gen que codifica la proteína, el fosfopéptido detectado en mediante

#### 4. Resultados.

espectrometría de masas (se indica con un asterisco el residuo fosforilado), la posición del residuo o residuos fosforilados en la secuencia de la proteína, y las veces (*fold*) de variación relativa en fosforilación tras el tratamiento con TRH. Solo se indican aquellas proteínas con una variación  $> 2$  ó  $< 0,5$ .

Proteína	Variación	Variación	Función
	H36/T1	GH3	
AGFG1	0,4	0,45	Transporte de RNA
APC	0,5	3,4	Activación GEF
ARHGEF2	1,55	0,6	Activación de Rho GTPasas
EF1D	2,15	3,5	Factor de elongación
ERK1	19	16	Quinasa
ERK2	37	14	Quinasa
HIVEP2	0,34	0,26	Regulador de la transcripción
IWS1	1,9	2,3	Factor transcripción
MAP1B	2,9	0,6	Unión a tubulina
MAP1S	0,25	0,3	Unión a tubulina
MARCKS	2,2	2,6	Unión a calmodulina, substrato de PKC
MARCSL1	0,7	3	Unión a calmodulina, substrato de PKC
MBB1A	0,4	0,5	Regulador de la transcripción
NMT1	0,7	0,6	Aciltransferasa
SPTA2	10,48	0,12	Componente del citoesqueleto
STMN1	53	0,4	Desestabilización de microtúbulos, inactiva por fosforilación
TAU	2,45	0,7	Formación y estabilización de microtúbulos
THRAP3	1,58	0,42	Regulador de la transcripción
ZC3H18	2,67	0,23	Otros

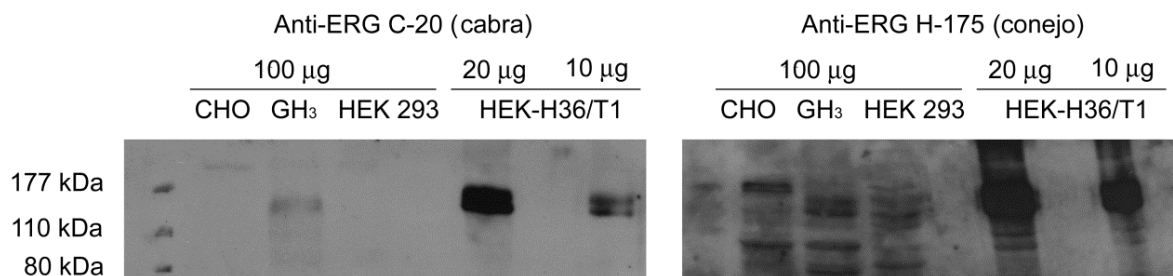
**Tabla XIII. Proteínas con variaciones en los niveles de fosforilación identificadas mediante espectrometría de masas cuantitativa en los dos tipos celulares.** Se muestran aquellas proteínas con niveles de fosforilación significativamente distintos tras el tratamiento con TRH identificadas tanto en células GH<sub>3</sub> como en células HEK-H36/T1. Se indica el nombre de la proteína, sus niveles de fosforilación relativos tras el tratamiento con TRH y la función que desempeña la proteína.

#### 4.4. Estudio de los canales *erg* a nivel molecular: interacciones proteicas y fosforilación.

Aunque se ha propuesto que en la regulación de la actividad de los canales *erg* por TRH son necesarios uno o varios pasos de fosforilación para la transducción de la señal (Barros *et al.* 1993), se desconoce a qué nivel de la cascada de señalización se produce esta fosforilación, si es mediada por una o varias proteínas transductoras y si se fosforilan (también) directamente los canales *erg*. Así, nuestro siguiente objetivo fue estudiar si los canales *erg* están o no fosforilados y si esa posible fosforilación varía en respuesta a la TRH.

#### 4.4.1 Optimización de la detección de las proteínas *erg*.

Como un primer paso para los estudios de fosforilación de los canales *erg*, comenzamos por optimizar el sistema de detección de los mismos tanto en células GH<sub>3</sub> como en las HEK-H36/T1. Para ello probamos dos anticuerpos policlonales de la casa Santa Cruz Biotechnology, cada uno de ellos desarrollado contra una región distinta de la proteína *erg*: el C-20 desarrollado en cabra, que reconoce una región en el dominio carboxilo terminal, y el H-175 desarrollado en conejo contra un epítipo de la zona amino proximal. Para probar la efectividad de cada uno de ellos en ambos tipos celulares realizamos un análisis western tanto de extractos de células GH<sub>3</sub> y HEK-H36/T1, como de CHO y HEK293 como controles negativos de expresión del canal. Cargamos 100 µg de cada extracto celular, excepto en el caso de la línea HEK-H36/T1 que sobreexpresa el canal hERG, de la que cargamos solamente 10 y 20 µg.



**Figura 63. Comparación de análisis western utilizando dos anticuerpos diferentes para *erg*.** Se indica el tipo celular y los µg de proteína de sus extractos cargados en cada calle. La detección se realizó utilizando como anticuerpos primarios anti-*erg* C-20 1:1000 (izquierda) o anti-*erg* H-175 1:1000 (derecha) y como anticuerpos secundarios anti-*goat* 1:2000 o anti-*rabbit* 1:2000, respectivamente.

En la Figura 63 se puede observar que ambos anticuerpos permiten detectar la expresión de *erg* tanto en células HEK-H36/T1 como, en menor medida, en las GH<sub>3</sub>. Vemos así que es posible distinguir dos bandas de tamaños compatibles con los de *erg*, que deben corresponder al canal inmaduro sin glicosilar (135 KDa) y a la forma madura glicosilada que tiene una movilidad electroforética algo más reducida (155 KDa) (Gong *et al.* 2002, 2005). Además, en el western blot en el que se usó el anticuerpo C-20 se obtuvo una señal más intensa y específica que en el caso del H-175, que también se une de forma un tanto inespecífica a proteínas de células control HEK293 y CHO. Por ello, para los siguientes experimentos utilizamos el anticuerpo anti-*erg* C-20 de cabra.

#### 4.4.2. Inmunoprecipitación de canales *erg*.

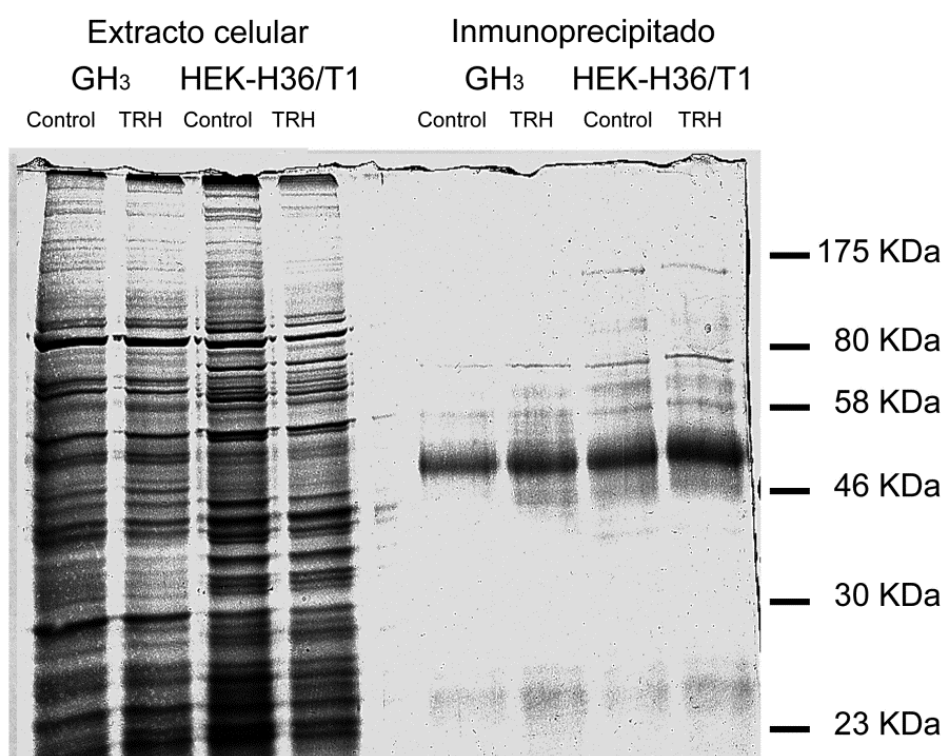
Usando el anticuerpo anti-*erg* C-20 nos propusimos intentar la inmunoprecipitación de los canales *erg* a partir de extractos de células GH<sub>3</sub> y HEK-H36/T1, para obtener una preparación enriquecida tanto en la proteína del canal como en otras que pudieran interactuar con ella.



#### 4. Resultados.

Para ello utilizamos unas condiciones de solubilización suaves (ver Métodos) que permitirían la co-inmunoprecipitación de esas otras posibles proteínas que puedan interactuar con el canal, y estar implicadas en la regulación basal y/o hormonal del mismo.

Para la inmunoprecipitación del canal *erg* partimos de extractos de células control y tratadas con TRH 1  $\mu$ M 5 min de cada tipo celular y procedemos como se describió en el apartado 3.2.12. de Métodos. Una vez obtenidos los inmunoprecipitados de cada tipo celular, intentamos identificar las proteínas presentes en ellos y tratamos de analizar si se producía alguna variación en su presencia tras el tratamiento con TRH. Para visualizar el resultado de las inmunoprecipitaciones utilizamos tanto una tinción con Azul de Coomassie, para ver el perfil proteico de los extractos y los precipitados, como un análisis western con el anticuerpo anti-*erg* para identificar las bandas de la proteína del canal.



**Figura 64. Perfil proteico de extractos celulares e inmunoprecipitados de células GH<sub>3</sub> y HEK-H36/T1.** En cada calle se cargó o bien 100  $\mu$ g de proteína de los extractos de células tratadas o no con TRH 1  $\mu$ M, o bien el inmunoprecipitado obtenido a partir de 0,5 mg de proteína de extracto tratado con 1  $\mu$ g de anticuerpo anti-*erg* C-20. La electroforesis se realizó en SDS-PAGE al 10 %, y el gel se tiñó con Azul de Coomassie.

En la

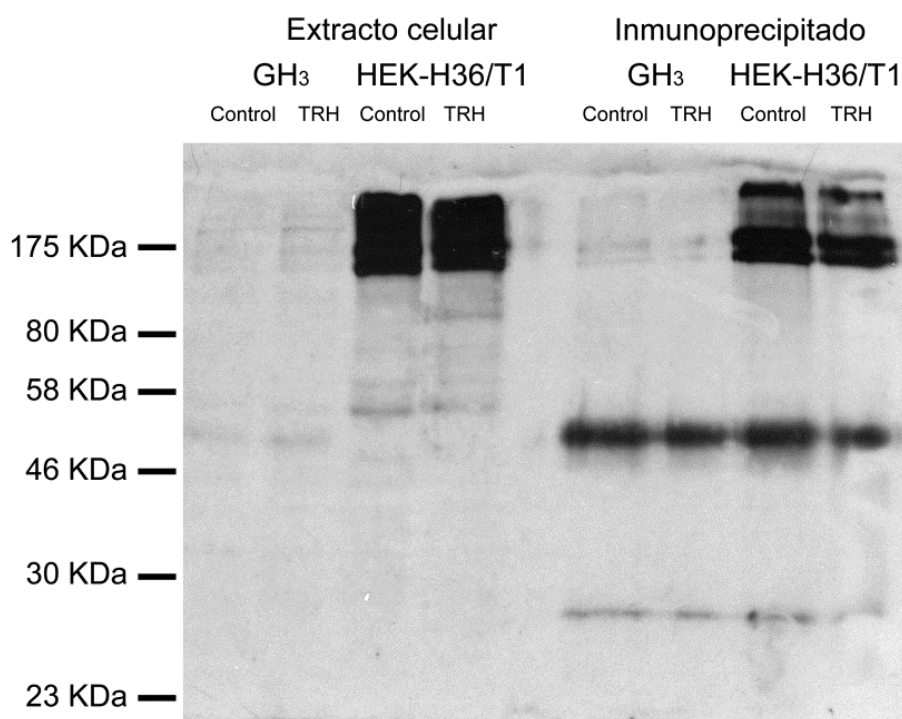
Figura 64 podemos ver que tras la inmunoprecipitación de extractos celulares de HEK-H36/T1 se detecta una banda de tamaño elevado (algo menor de 175 kDa) que previsiblemente corresponde al canal hERG (135 kDa). Sin embargo en los inmunoprecipitados de extractos de células GH<sub>3</sub> no es posible detectar ninguna banda de ese tamaño. Esto podría deberse a que los

bajos niveles de expresión del canal rERG en las células GH<sub>3</sub> impidieran su detección con una tinción poco sensible como la del Coomassie. Por tanto, como se indicará a continuación y para comprobar si se había producido o no una inmunoprecipitación de la proteína rERG en esas células usamos un análisis western. Por otra parte, en los inmunoprecipitados de ambos tipos celulares se observan dos bandas mayoritarias, que corresponden a la cadena pesada (48 KDa) y ligera (27 KDa) del anticuerpo utilizado para la precipitación. Además se detectan otras bandas que han co-inmunoprecipitado al tratar los extractos con el anticuerpo anti-*erg*, si bien en ninguno de los tipos celulares se aprecian diferencias entre las bandas detectadas en células control respecto a las tratadas con TRH (

Figura 64). En cualquier caso, al comparar los inmunoprecipitados con los extractos totales podemos ver que la cantidad de otras proteínas distintas de *erg* presentes en la muestra ha disminuido en gran medida, por lo que, al menos en el caso de las células HEK-H36/T1, podemos decir que hemos conseguido enriquecer la muestra en canal hERG, lo cual previsiblemente nos será útil en estudios posteriores.

Para comprobar si las bandas de alto peso molecular detectadas en la inmunoprecipitación de la Figura 64 corresponden a los canales *erg*, realizamos sobre las mismas muestras un análisis western con anticuerpo anti-*erg* (Figura 65). En las calles correspondientes a las células HEK-H36/T1 se observa una señal muy intensa de hERG, tanto en los extractos como en los inmunoprecipitados, detectándose en ambos casos dos bandas, que previsiblemente corresponden a las formas madura e inmadura del canal. De hecho, la menor de estas bandas tiene el mismo tamaño que la observada con Coomassie. En cuanto a las células GH<sub>3</sub>, aunque en la detección con Coomassie no habíamos sido capaces de detectar el canal rERG, al realizar el análisis western sí se observan dos bandas proteicas en los inmunoprecipitados, con tamaños iguales a los de las células HEK-H36/T1. Esa señal, casi imperceptible en los extractos, se detecta de forma aún débil pero clara en los inmunoprecipitados, en los que se puede incluso diferenciar pues entre la forma madura y la inmadura del canal. Por tanto, podemos afirmar que la inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-*erg* C-20, aunque en menor medida que en HEK-H36/T1, también funciona en las células GH<sub>3</sub>.

#### 4. Resultados.



**Figura 65. Análisis Western con anticuerpo anti-*erg* de extractos celulares e inmunoprecipitados de células GH<sub>3</sub> y HEK-H36/T1.** La identificación, cantidades y separación de las muestras se realizó como se indica en la Figura 64. En lugar de teñir los gels con Coomassie se procesaron para análisis western utilizando para la detección como anticuerpo primario anti- *erg* C-20 1:1000 y anticuerpo secundario anti-goat 1:2000.

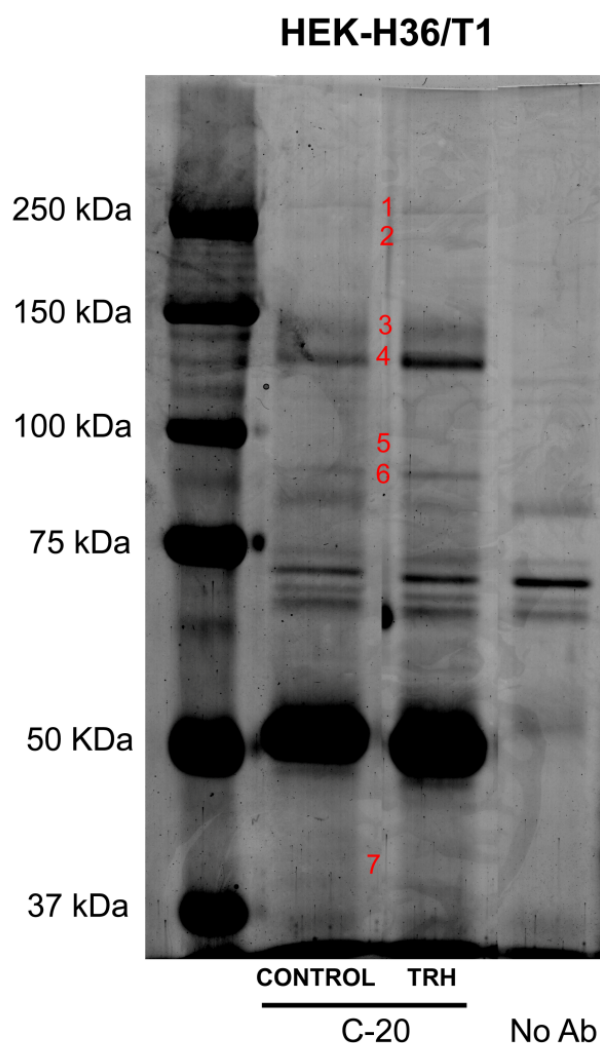
Por otra parte también nos planteamos el uso de estos inmunoprecipitados como material de partida en el que estudiar qué proteínas o subunidades pueden estar asociadas al canal y que por ello pudieran estar también implicadas en el control de su actividad basal y/o en su regulación por TRH. Para ello, realizamos en primer lugar inmunoprecipitaciones de canales *erg* usando extractos de células HEK-H36/T1 y GH<sub>3</sub> tanto control como tratadas con TRH. Los inmunoprecipitados se sometieron a una SDS-PAGE seguida de una tinción con Azul de Coomassie coloidal, una variante técnica con mayor sensibilidad que la del Coomassie normal, para tratar así de identificar las bandas correspondientes a *erg* y al resto de proteínas que hubieran inmunoprecipitado. A continuación, las bandas correspondientes tanto a *erg* como a las demás proteínas co-inmunoprecipitadas, se procesaron para su análisis mediante espectrometría de masas. De nuevo, estos experimentos fueron realizados durante una estancia en el grupo del Dr. Pedro Cutillas del Barts Cancer Research de la Queen Mary University of London.

Para la inmunoprecipitación con las células HEK-H36/T1, usamos 20 µg del anticuerpo anti-*erg* C-20 y 10 mg de extractos de células control y tratadas con TRH 1 µM 5 min. Además, como control negativo de inmunoprecipitación, sometimos un extracto al mismo protocolo de

inmunoprecipitación pero sin utilizar anticuerpo, para así poder identificar y descartar las bandas que precipiten de forma inespecífica en el proceso. En la Figura 66 se muestra un gel SDS-PAGE al 8 % teñido con Coomassie coloidal para visualizar el resultado de la inmunoprecipitación. Tras la observación de los resultados, seleccionamos en este gel las bandas de interés, las recortamos y las procesamos para su análisis mediante espectrometría de masas. Se recogieron un total de siete bandas del inmunoprecipitado control y otras siete del inmunoprecipitado del tratamiento con TRH. En cada caso, dos de estas bandas corresponden previsiblemente a hERG (bandas 3 y 4), mientras que las otras cinco bandas son proteínas que co-inmunoprecipitan con hERG usando el anticuerpo C-20. Vemos que en estas condiciones las preparaciones están enriquecidas en la proteína del canal, ya que las bandas 3 y 4 se detectan claramente en el gel, especialmente la segunda, que corresponde a la forma glicosilada. Las bandas seleccionadas se recortaron y se procesaron para su posterior análisis mediante LC-MS/MS. Tras el análisis mediante Mascot de los datos obtenidos por espectrometría de masas, se pudieron identificar las proteínas correspondientes, que son las que se indican en la

Tabla XIV. De este modo se identificó al canal hERG en las bandas 3 y 4, así como a alguna de las otras proteínas que co-inmunoprecipitaron con él: la proteína CAD de 242 kDa (banda 1), una proteína con actividad enzimática trifuncional que cataliza los tres primeros pasos de la síntesis *de novo* de pirimidina; la Nucleoporina 210 kDa (banda 2) que forma parte del anclaje del complejo del poro a la membrana nuclear; la SatB1 de 85 kDa, una proteína fundamental en la reorganización de la cromatina y el control de la expresión génica; la Calnexina de 67 kDa (banda 6), una proteína chaperona que actúa asegurando el correcto plegamiento de glicoproteínas en el retículo endoplásmico y, finalmente, la Erlina 2 de 37 kDa (banda 7), una proteína que interviene en la degradación de receptores de IP3 asociados al retículo endoplásmico. Nótese, no obstante, que parece improbable que alguna de estas proteínas identificadas pueda tener algún papel en la regulación hormonal de la actividad de los canales hERG, aunque la calnexina podría estar implicada en su correcta síntesis en el retículo endoplásmico (Wang *et al.* 2012).

#### 4. Resultados.

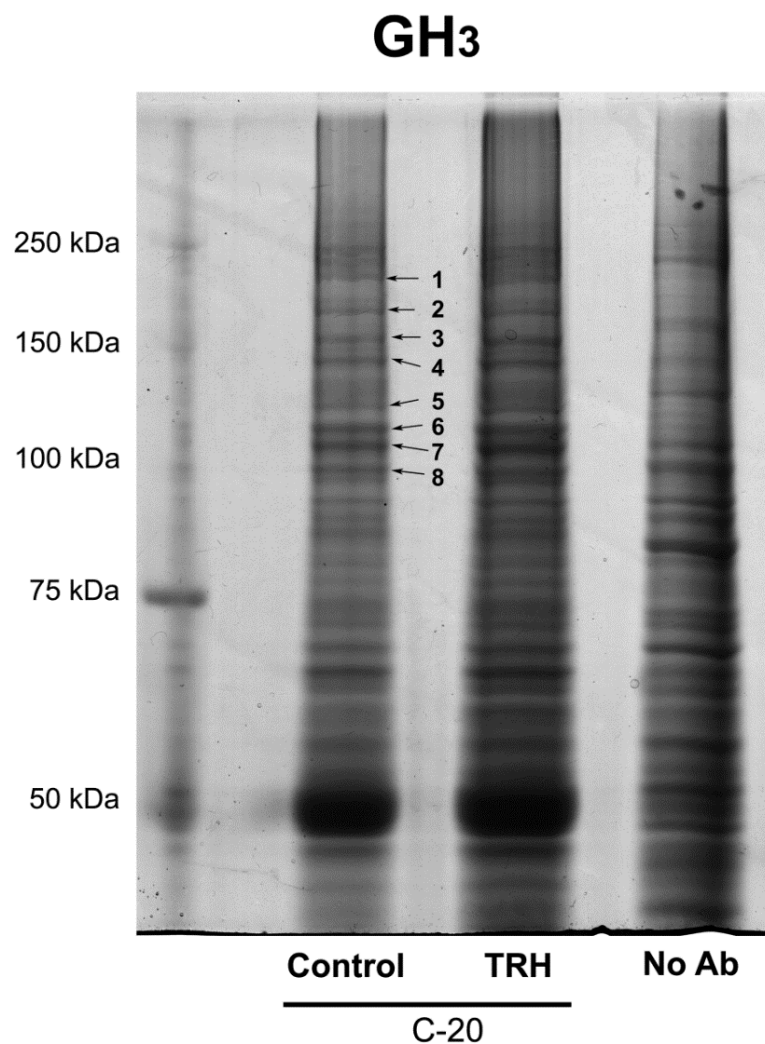


**Figura 66. Análisis electroforético del inmunoprecipitado de canales hERG obtenidos de células HEK-H36/T1 tratadas o no con TRH.** La inmunoprecipitación se realizó a partir de 10 mg de extracto celular, usando 20  $\mu$ g de anticuerpo C-20. El inmunoprecipitado resultante se resuspendió en 50  $\mu$ l. Como control negativo se cargó un inmunoprecipitado al cual no se añadió anticuerpo durante la inmunoprecipitación (No Ab). Los 50  $\mu$ l de cada inmunoprecipitado se analizaron en un gel SDS-PAGE al 8 % que fue luego teñido mediante la técnica de Coomassie coloidal. Se indican con números del 1 al 7 las bandas seleccionadas para su análisis mediante LC-MS/MS. La región correspondiente a las mismas se cortó tanto en los inmunoprecipitados sin tratar (Control) como en los tratados con TRH.

Banda	Proteína	Nombre del Gen	Peso molecular (kDa)
1	CAD Protein	CAD	242
2	Nuclear pore membrane glycoprotein 210	NUP210	205
3	Potassium voltage-gated channel subfamily H member 2	KCNH2	150
4	Potassium voltage-gated channel subfamily H member 2	KCNH2	135
5	DNA Binding protein SatB1	SATB1	85
6	Calnexin	CANX	67
7	Erlin-2	ERLIN2	37

**Tabla XIV. Proteínas identificadas en los inmunoprecipitados con anticuerpo anti-erg en células HEK-H36/T1.** Se indica la banda a la que corresponde la proteína identificada en la Figura 66, el nombre de la proteína, el nombre del gen que la codifica y el peso molecular.

A continuación, realizamos un análisis análogo con las células GH<sub>3</sub> (Figura 67). En este caso, la precipitación produjo un perfil de bandas menos específico, ya que se observa un mayor número de ellas a lo largo de toda la calle tanto en las muestras con como en la sin anticuerpo. A pesar de ello se pueden distinguir varias bandas características sólo de la inmunoprecipitación en presencia de anticuerpo. Así, seleccionamos 8 bandas tanto de los inmunoprecipitados control como de los tratados con TRH, incluyendo las más intensas de la zona comprendida entre los 100 y 150 kDa donde se debería localizar rERG (las marcadas como 3, 4, 6 y 7 en la Figura 67), y las procesamos para su análisis mediante LC-MS/MS como se ha explicado anteriormente.



**Figura 67. Análisis electroforético del inmunoprecipitado de canales rERG obtenidos de células GH<sub>3</sub> tratadas o no con TRH.** La inmunoprecipitación se realizó a partir de 10 mg de extracto celular usando 20 µg de anticuerpo C-20 y el inmunoprecipitado resultante se resuspendió en 50 µl. Como control negativo se cargó un inmunoprecipitado al cual no se añadió anticuerpo durante la inmunoprecipitación (No Ab). Los 50 µl de cada inmunoprecipitado se analizaron en un gel SDS-PAGE al 8 % que fue luego teñido mediante la técnica de Coomassie coloidal. Se indican con números del 1 al 8 las bandas seleccionadas para su análisis mediante LC-MS/MS. La región correspondiente a las mismas se cortó tanto en los inmunoprecipitados sin tratar (Control) como en los tratados con TRH.

#### 4. Resultados.

Banda	Proteína	Nombre del Gen	Peso molecular (kDa)
1	Nuclear pore membrane glycoprotein 210	Nup210	210 kDa
2	DNA topoisomerase 2-alpha	Top2a	174 kDa
3	Myb-binding protein 1A	Mybbp1a	152 kDa
5	Nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1	Nolc1	74 kDa
6	Matrin-3	Matr3	94 kDa
8	Nucleolin	Ncl	77 kDa

**Tabla XV. Proteínas identificadas en la co-inmunoprecipitación de rERG en células GH<sub>3</sub>.** Se indica la banda de la Figura 67 a la que pertenece la proteína identificada, el nombre de la proteína, el nombre del gen que la codifica y el peso molecular.

Tras el análisis mediante Mascot se pudieron identificar las proteínas correspondiente a varias de las bandas seleccionadas, tal y como se indica en la Tabla XV. De este modo se identificaron la Nucleoporina 210 kDa (banda 1), que ya había aparecido en los inmunoprecipitados de células HEK-H36/T1, la Topoisomerasa 2 alfa de 174 kDa (banda 2), un enzima implicado en el control de los superenrollamientos del DNA, la proteína de unión a Myb 1a, de 152 kDa (banda 3), que participa en la regulación de la expresión génica mediante la interacción con proteínas de unión a secuencias específicas de DNA, la fosfoproteína nucleolar y de los cuerpos de Cajal 1 de 74 kDa (banda 5), fundamental en el mantenimiento de la estructura del nucleolo, la Matrina 3 de 94 kDa (banda 6) una proteína de la matriz nuclear, y, finalmente, la Nucleolina de 77 kDa (banda 8), una fosfoproteína nucleolar implicada en la síntesis y maduración de los ribosomas. Sin embargo, no fuimos capaces de identificar mediante espectrometría de masas a la proteína rERG en ninguna de las bandas analizadas. Es probable que esto sea debido a los bajos niveles de expresión del canal en estas células, sobre todo si lo comparamos con la sobreexpresión de hERG en las células HEK-H36/T1. También es posible que a este resultado negativo contribuya la menor afinidad de los anticuerpos por el canal rERG de rata, ya que fueron diseñados contra la proteína humana hERG. Dado que en experimentos anteriores habíamos conseguido detectar rERG en las células GH<sub>3</sub> mediante análisis western, quizás el conjunto del proceso de inmunoprecipitación no fue tan efectivo como para enriquecer suficientemente la muestra para poder detectarlo por espectrometría de masas. Nótese también que todas las proteínas de las células GH<sub>3</sub> identificadas en este experimento son proteínas nucleares, que no parecen tener relación con la regulación hormonal de los canales *erg*. Así, su aparición en el gel parece más debida a una interacción inespecífica con el anticuerpo utilizado que a una co-inmunoprecipitación con rERG. Es interesante destacar que tanto en células HEK-H36/T1 como GH<sub>3</sub>, una de las proteínas identificadas es la Nucleoporina 210. Sin embargo, de nuevo su

naturaleza nuclear hace pensar que su presencia quizá se deba más a una interacción inespecífica con el anticuerpo utilizado que a una co-precipitación fruto de su interacción con *erg*.

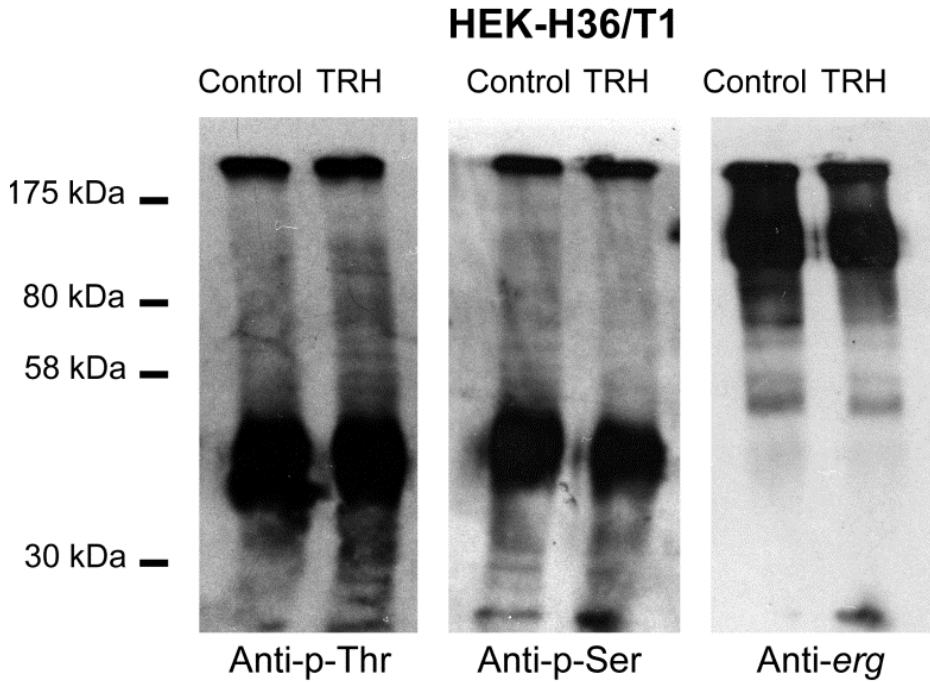
#### 4.4.3. Estudios de fosforilación de los canales *erg*.

Una vez examinada la eficacia de la inmunoprecipitación para obtener preparaciones enriquecidas en canal *erg*, pasamos a estudiar el estado de fosforilación de los canales y si éste es afectado por el tratamiento con TRH. En primer lugar sometimos a inmunoprecipitación con anticuerpos anti-*erg* extractos de células HEK-H31/T1 tratadas o no con TRH 1  $\mu$ M 5 min. Esos inmunoprecipitados fueron sometidos a análisis western utilizando anticuerpos específicos para fosfotreonina (Cell Signaling #9381) o fosfoserina (Sigma-Aldrich p3430), que son los residuos más comúnmente fosforilados, tras lo cual usamos un anticuerpo anti-*erg* para identificar qué bandas de proteínas fosforiladas se correspondían con el tamaño de *erg*. En la Figura 68 se observa que en los inmunoprecipitados de células HEK-H36/T1 se detectan varias proteínas fosforiladas tanto en treonina como en serina. Aunque parece haber diferencias de intensidad en varias bandas al comparar células tratadas con no tratadas con TRH, el efecto parece deberse a diferencias en cantidad de muestra total y/o detección irregular, ya que se observa todo a lo largo de las calles. En cualquier caso, en la zona superior de las calles correspondientes a ambos anticuerpos fosfoespecíficos se pueden distinguir bandas de fosforilación de un tamaño que corresponde con el observado tras realizar la detección con anticuerpo anti-*erg*, lo cual sugiere la presencia de serinas y treoninas fosforiladas en el canal hERG de estas células.

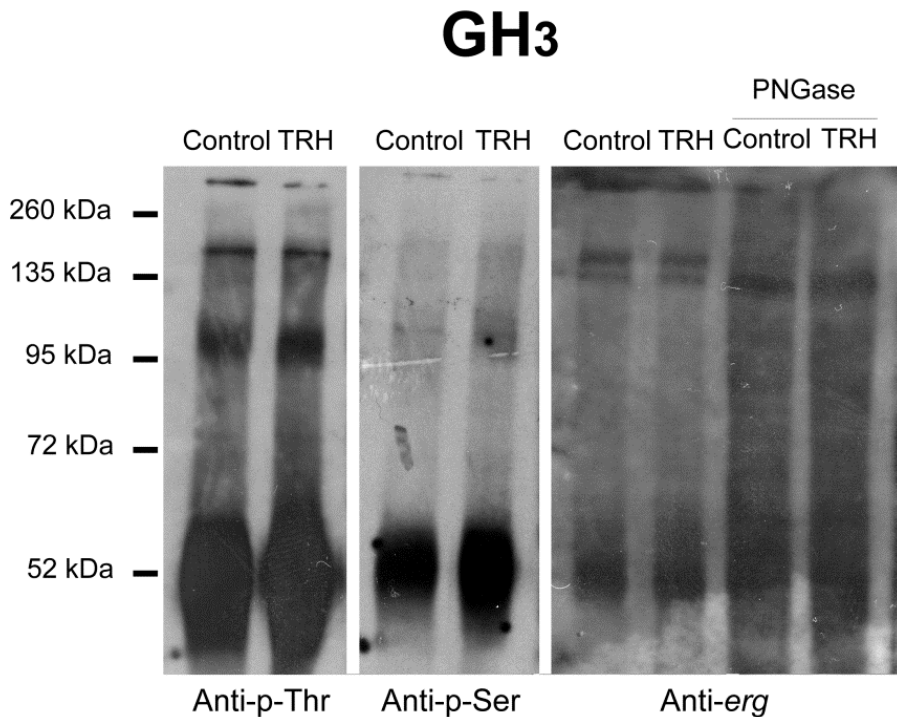
En la Figura 69 se muestra un experimento equivalente con células GH<sub>3</sub>. En este caso, se trató además parte del inmunoprecipitado con N-Glicosidasa (PNGasa), a fin de averiguar si la fosforilación del canal se observa en la proteína madura, en la inmadura o en ambas (Gong *et al.* 2005). Podemos ver que en la detección con anticuerpo anti-fosfotreonina se aprecia una banda intensa de fosforilación de un tamaño ligeramente superior a los 135 KDa. Algo similar ocurre en el western con anti- fosfoserina, aunque en este caso la señal de fosforilación del aminoácido es mucho más tenue. Al comparar esta banda con las dos detectadas utilizando anticuerpo anti-*erg*, podemos observar que coincide en tamaño con la banda superior, la cual correspondería a la proteína madura glicosilada del canal, ya que desaparece tras el tratamiento con PNGasa.



4. Resultados.

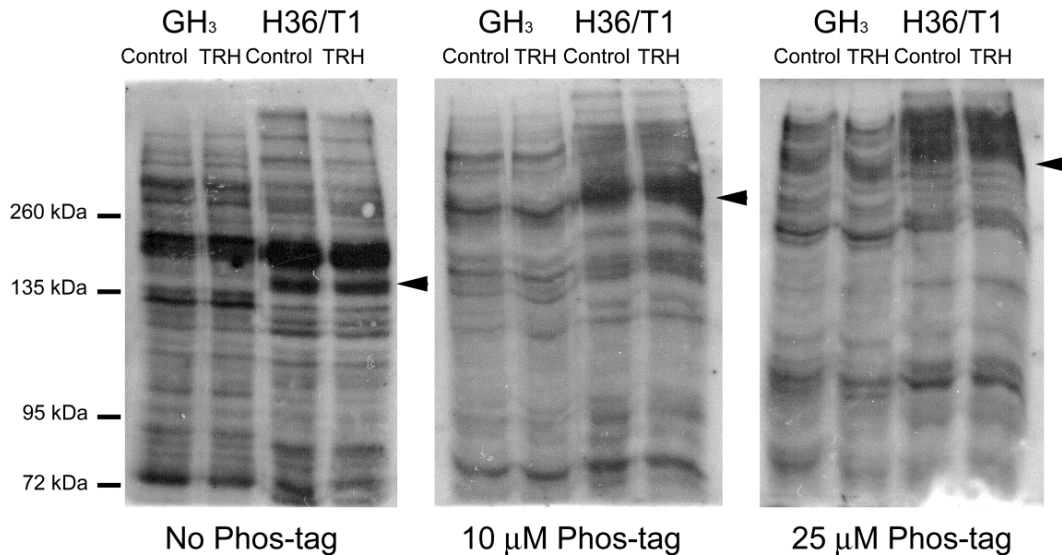


**Figura 68. Análisis Western con anticuerpos fosfoespecíficos de inmunoprecipitados de células HEK-H36/T1.** Se cargaron en cada calle 20  $\mu$ l del total del inmunoprecipitado resuspendido en 100  $\mu$ l y obtenido a partir de 0,5 mg de proteína de extractos control o tratados con TRH 1  $\mu$ M 5 min que fueron inmunoprecipitados con 1  $\mu$ g de anticuerpo anti-erg C-20. La electroforesis se realizó en SDS-PAGE al 10 %, utilizando anticuerpos anti-p-Thr (#9381), anti-p-Ser (p3430) o anti-erg H-175 (1:1000) y el anticuerpo secundario correspondiente (1:2000).



**Figura 69. Análisis Western con anticuerpos fosfoespecíficos de inmunoprecipitados de células GH3.** En cada calle se cargaron 20  $\mu$ l del total del inmunoprecipitado (I.P.) resuspendido en 100  $\mu$ l y obtenido a partir de 0,5 mg de proteína de extractos control o tratados con TRH 1  $\mu$ M 5 min que fueron precipitados con 1  $\mu$ g de anticuerpo anti-erg C-20. Cuando se indica, la carga se realizó con inmunoprecipitado tratado con PNGasa (I.P. + PNGasa). La electroforesis se realizó en SDS-PAGE al 10 %, utilizando anti-p-Thr (#9381), anti-p-Ser (p3430) o anti-erg H-175 (1:1000) y el anticuerpo secundario correspondiente (1:2000).

Como complemento a estos experimentos y para confirmar el estado fosforilado de *erg* en ambos tipos celulares, realizamos análisis western con anticuerpo anti-*erg* de extractos celulares control y tratados con TRH 1  $\mu$ M 5 min, pero utilizando en este caso en la separación geles de SDS-PAGE con cantidades crecientes de Phos-tag (Wako Pure Chemical Industries, Ltd), una molécula que une específicamente moléculas fosforiladas (Kinoshita *et al.* 2004). Al añadir Phos-tag a un gel de acrilamida se provoca una reducción de la movilidad de las proteínas fosforiladas, lo cual permite diferenciar proteínas fosforiladas de no fosforiladas según muestran o no esa reducción (Tomida *et al.* 2008; Kosako 2009). Como podemos ver en los análisis western de la Figura 70, las bandas correspondientes a los canales *erg* detectadas tanto en extractos celulares de GH<sub>3</sub> como de HEK-H36/T1 sufren un retraso en la movilidad al incluir 10  $\mu$ M de Phos-tag en el gel, retraso que es mayor en presencia de Phos-tag 25  $\mu$ M, lo que corrobora la presencia de residuos fosforilados en la molécula de *erg* en ambos tipos celulares. Además, no se observa una diferente migración en función del tratamiento con TRH, lo que sugiere que el estado de fosforilación podría no verse afectado por el tratamiento hormonal. Nótese no obstante la baja especificidad de detección de estos experimentos, lo cual complica extraer una conclusión más definitiva a ese respecto.

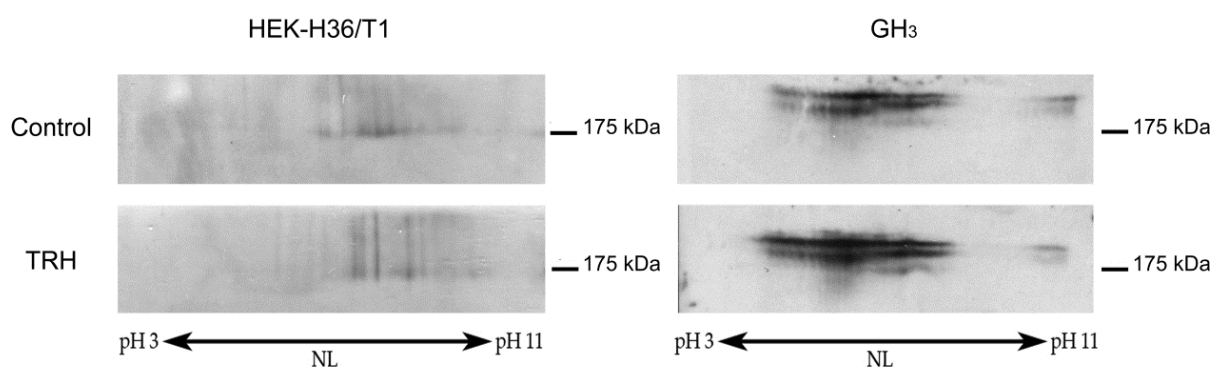


**Figura 70. Estudio de la movilidad electroforética de *erg* en geles SDS-PAGE con concentraciones crecientes de Phos-Tag.** Análisis western de extractos celulares de GH<sub>3</sub> y HEK-H36/T1 (60  $\mu$ g por calle) control o tratadas 5 min con TRH 1  $\mu$ M. La separación electroforética se hizo en en geles SDS-PAGE al 10 % sin o con las concentraciones indicadas de Phos-tag. La detección se realizó utilizando como anticuerpos primario y secundario anti-*erg* C-20 1:1000 y anti-goat 1:2000, respectivamente.

Los experimentos con anticuerpos fosfoespecíficos y con Phos-tag descritos hasta el momento parecen sugerir que los canales *erg* están fosforilados tanto en células GH<sub>3</sub> como en las HEK-H36/T1, y que el nivel de esta fosforilación no varía en función del tratamiento con

#### 4. Resultados.

TRH. Sin embargo, dado el gran tamaño del canal, es posible que presente múltiples sitios de fosforilación y que los hipotéticos cambios en respuesta a la TRH puedan tener lugar sólo en uno o unos pocos de estos sitios, haciendo que las formas fosforiladas sean detectadas de forma similar con los anticuerpos fosfoespecíficos y retardadas de modo parecido por el Phos-tag. Por tanto, para tratar de encontrar un sistema con el que discernir si el tratamiento con TRH alteraba de forma parcial el estado de fosforilación de *erg* (es decir, solo en alguno de los fosfositios), decidimos analizar la movilidad electroforética del canal mediante 2D-PAGE seguida de análisis western con anticuerpos anti-*erg*. De esta manera pretendíamos ver si el tratamiento de células HEK-H36/T1 o GH<sub>3</sub> con TRH 1  $\mu$ M durante 5 min provocaba cambios en el punto isoeléctrico de la proteína *erg* al cambiar el estado de fosforilación de algunos de sus residuos, dando lugar a la modificación de la posición de los *spots* correspondientes.



**Figura 71. Análisis western tras electroforesis bidimensional del efecto de la TRH sobre el estado de fosforilación de *erg* en células HEK-H36/T1 y GH<sub>3</sub>.** . Las muestras corresponden a 125  $\mu$ l de extractos de concentración ecualizada de células HEK-H36/T1 (izquierda) y GH<sub>3</sub> (derecha) control y tratadas 5 min con TRH 1  $\mu$ M. La detección se realizó con anticuerpo anti-*erg* (1:1000) y anticuerpo secundario anti-goat (1:2000). Se indica en cada caso el rango de pH (no lineal, NL) utilizado para la primera dimensión de la electroforesis.

Como se observa en la Figura 71, la detección de *erg* en los extractos de ambos tipos celulares muestra un enfoque pobre, apareciendo de forma dispersa a lo largo del gel. Esta falta de definición de las manchas se debe con toda probabilidad al carácter glicoproteico de *erg*, ya que se ha descrito que la glicosilación da origen a una dispersión similar en las electroforesis bidimensionales (Sondej *et al.* 2009). Sin embargo, resulta aún posible comparar la distribución de las manchas proteicas en condiciones control y tras el tratamiento con TRH. Así, en las células HEK-H36/T1 podemos observar que las manchas proteicas más intensas migran hacia pH más ácidos tras el tratamiento con la TRH, lo cual es un indicador de aumento en la fosforilación de la proteína. Por su parte, en las células GH<sub>3</sub> el desplazamiento en el eje del pH se produce en ambos sentidos en respuesta a la TRH, lo que sugiere que el tratamiento con TRH provoca tanto procesos de fosforilación que disminuirían el punto isoeléctrico, como de desfosforilación que lo aumentarían. Así pues, parece que tras el tratamiento con TRH sí se

producen realmente cambios en el estado de fosforilación de los canales *erg*, tanto en células GH<sub>3</sub> como en las HEK-H36/T1.

#### **4.4.4. Identificación poteómica de los sitios de fosforilación del canal hERG y sus cambios en respuesta a TRH en células HEK-H36/T1.**

A la vista de los resultados que acabamos de describir, nos planteamos identificar en qué residuos de hERG se podían localizar las fosforilaciones y cómo éstas podrían variar en respuesta a la TRH. En primer lugar realizamos un análisis más detallado de las bandas 3 y 4 de la inmunoprecipitación de la Figura 66 correspondientes al canal. Así, de entre todos los péptidos de hERG detectados mediante LC-MS/MS encontramos 14 péptidos fosforilados presentes tanto en las muestras control como en las tratadas con TRH. Varios de ellos corresponden a la misma secuencia con distinto valor de carga iónica o modificación química, por lo que solo identificamos 8 residuos fosforilados distintos en 10 de esos fosfopéptidos. Estos residuos corresponden a las Ser239, Ser243, Ser283, Ser284, Ser320 y Ser351, situadas en el dominio amino proximal, y las Ser871 y Ser1137 del extremo carboxilo. Comparando los niveles de estos fosfopéptidos a partir de las bandas procedentes de inmunoprecipitados de células control y tratadas con TRH, observamos que sólo en el caso de Ser243 (4,17 veces) y Ser1137 (7,05 y 12,53 veces) se produce un aumento de la fosforilación en respuesta a TRH, mientras que en Ser284 y Ser351 los niveles de los péptidos fosforilados son menos de la mitad que los de la muestra control (0,4 y 0,36 veces respectivamente) (

Tabla XVI a).

A continuación ampliamos estos estudios partiendo directamente de fosfopéptidos obtenidos de extractos totales de células HEK-H36/T1 y GH<sub>3</sub>, identificando entre ellos los péptidos de *erg* fosforilados y comparando sus niveles de fosforilación entre los provenientes de células control y tratadas con TRH 1  $\mu$ M 5 min. Para ello se realizaron tres experimentos con placas triplicadas, y para cada uno de ellos se procedió a una digestión trípica de los extractos seguida de una purificación de los fosfopéptidos mediante cromatografía de afinidad con TiO<sub>2</sub>. Los fosfopéptidos así obtenidos se analizaron por LC-MS/MS. Los datos resultantes fueron procesados usando Mascot Daemon (<http://www.matrixscience.com/daemon.html>) y se realizó un análisis estadístico de los resultados mediante el PESCAL (Cutillas y Vanhaesebroeck 2007), tomando como estadísticamente significativas aquellas variaciones en los niveles de fosforilación entre el control y el tratamiento con TRH que suponían un incremento o disminución superior a dos veces (incremento  $> 2$  ó  $< 0,5$ ) y con un p-valor  $< 0,05$  (

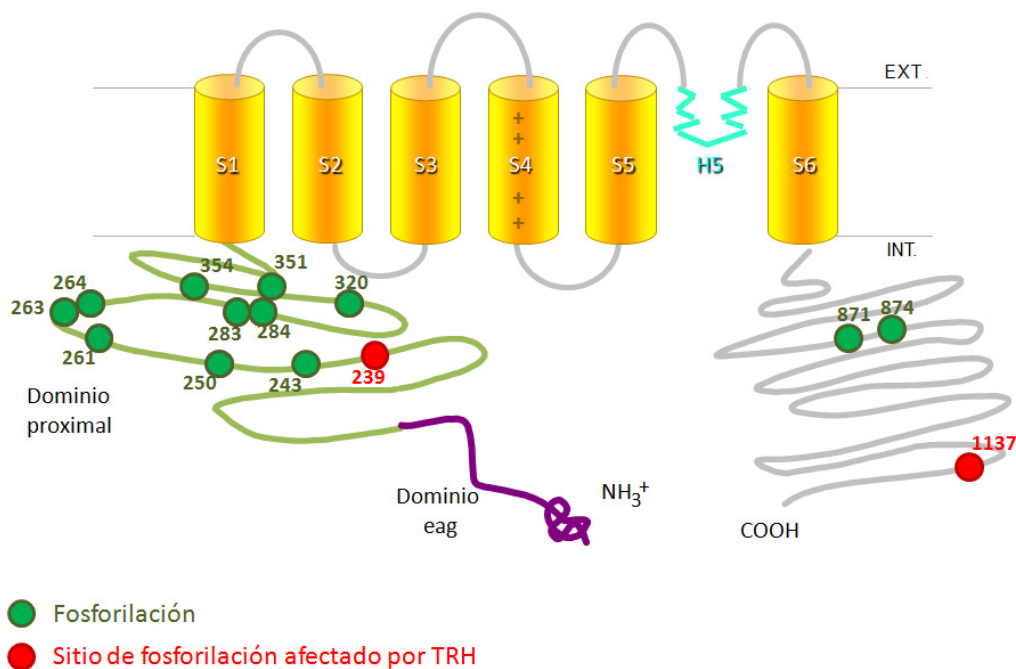
#### 4. Resultados.

Tabla XVI b, resaltados en negrita).

Péptido	Rango del péptido	Posición de la fosforilación	Variación	p-valor
<b>a. A partir de inmunoprecipitados de HEK-H36/T1 con anticuerpo anti-erg.</b>				
ALVGPGS*PPR	233 - 242	p-s239 (z = 2)	0,88	--
RALVGPGS*PPR	232 - 242	p-s239 (z = 3)	0,77	--
RALVGPGS*PPR	232 - 242	p-s239 (z = 2)	0,85	--
ALVGPGSPPRS*APGQLPSPR	233 - 252	p-s243 (z = 3)	4,17	--
RAS*SADDIEAMR	281 - 292	p-s283 (z = 2) + oxidación	1,22	--
RAS*SADDIEAMR	281 - 292	p-s283 (z = 3)+ oxidación	1,37	--
ASS*ADDIEAMR	282 - 292	p-s284 (z = 2)+ oxidación	0,48	--
RASS*ADDIEAMR	281 - 292	p-s284 (z = 2)	0,4	--
SGLLNSTS*DSDLVR	313 - 326	p-s320 (z = 2)	0,81	--
GDPFLAS*PTSDREIAPK	345 - 362	p-s351 (z = 2)	0,36	--
DTNMIPGS*PGSTELEGGFSR	864 - 883	p-s871 (z = 3)+ oxidación	0,64	--
DTNMIPGS*PGSTELEGGFSR	864 - 883	p-s871 (z = 2)+ oxidación	0,94	--
LS*LPGQLGALTSQPLHR	1136 - 1152	p-s1137 (z = 3)	7,05	--
RLS*LPGQLGALTSQPLHR	1135 - 1152	p-s1137 (z = 3)	12,53	--
<b>b. A partir de mezclas enriquecidas en fosfopéptidos de HEK-H36/T1.</b>				
<b>RALVGPGS*PPR</b>	<b>232 - 242</b>	<b>p-S239 (z = 3)</b>	<b>4,43</b>	<b>0,03</b>
ALVGPGS*PPR	233 - 242	p-S239 (z = 2)	9	0,63
SAPQLPS*PR	243 - 252	p-S250 (z = 2)	1,11	0,27
AHSLNPDAS*GSSCSLAR	253 - 269	p-S261 (z = 2)	3,67	0,08
AHSLNPDASGS*SCSLAR	253 - 269	p-S263 (z = 2)	0,58	0,08
AHSLNPDASGS*SCS*LAR	253 - 269	p-S263 p-S266 (z = 2)	1,41	0,48
RAS*SADDIEAMR	281 - 292	p-S283 (z = 2) + oxidación	2,42	0,24
RAS*S*ADDIEAMR	281 - 292	p-S283 p-S284 (z = 2)	1,51	0,59
ASS*ADDIEAMR	282 - 292	p-S284 (z = 2)	0,86	0,68
ASS*ADDIEAMR	282 - 292	p-S284 (z = 2) + oxidación	1,12	0,70
SGLLNSTS*DSDLVR	313 - 326	p-S320 (z = 2)	1,08	0,64
GDPFLASPTS*DR	345 - 356	p-S354 (z = 2)	2,04	0,08
GDPFLAS*PTS*DREIAPK	345 - 362	p-S351 p-S354 (z = 2)	1,65	0,14
DTNMIPGS*PGS*TELEGGFSR	864 - 883	p-S871 p-S874 (z = 2)	1,50	0,25
<b>RLS*LPGQLGALTSQPLHR</b>	<b>1135 - 1152</b>	<b>p-S1137 (z = 3)</b>	<b>18,37</b>	<b>0,02</b>
<b>RLS*LPGQLGALTSQPLHR</b>	<b>1135 - 1152</b>	<b>p-S1137 (z = 4)</b>	<b>0,46</b>	<b>0,01</b>
LS*LPGQLGALTSQPLHR	1136 - 1152	p-S1137 (z = 2)	0,77	0,58
LS*LPGQLGALTSQPLHR	1136 - 1152	p-S1137 (z = 3)	0,84	0,97

**Tabla XVI. Fosfopéptidos de hERG identificados mediante análisis LC-MS/MS de inmunoprecipitados y mezclas enriquecidas en fosfopéptidos de células HEK-H36/T1.** a. datos obtenidos a partir del análisis por espectrometría de masas tándem acoplado a cromatografía líquida de las bandas 3 y 4 de la Figura 66. b. datos obtenidos a partir de un análisis similar de extractos enriquecidos en fosfopéptidos. Se muestra en la tabla la secuencia del péptido identificada con la posición de la fosforilación señalada con un asterisco y en la segunda columna la posición que ocupa el péptido en la secuencia de hERG. También se muestran las modificaciones detectadas en cada péptido y el valor de ionización registrado en el MS/MS, la posición que ocupa dicha fosforilación en la secuencia de hERG y por último los niveles de fosforilación relativos de dicho péptido en la banda tratada con TRH respecto a la banda control. Los dos sitios de fosforilación mostrando variaciones significativas en respuesta a la TRH se resaltan en negrita.

En la Tabla XVI se muestran los resultados obtenidos para la identificación en las células HEK-H36/T1 de los fosfopéptidos de hERG, cuya ubicación en la secuencia se indica esquemáticamente en la Figura 72. Como se puede observar, encontramos 18 fosfopéptidos de hERG, entre los cuales se identificaron 14 sitios de fosforilación diferentes: S239, S243, S250, S261, S263, S264, S283, S284, S320, S351, S354, S871, S874 y S1137. Sólo dos de estos fosfopéptidos presentaban unos niveles de fosforilación significativos entre los tres experimentos analizados, con un p-valor menor de 0,05. Estas fosforilaciones corresponden a la de la S239 en la que se observó un incremento mayor de 4 veces tras el tratamiento con TRH, y a la de la S1137 en la que identificó el mismo péptido con dos valores distintos de ionización ( $z$ ) y con diferentes variaciones en respuesta a la TRH, aumentando 18 veces el nivel de fosforilación en el  $z = 3$ , y disminuyendo la fosforilación (0,4 veces) en el caso del péptido con carga  $z = 4$ , no obstante, la cantidad relativa éste era mucho menor que la del péptido  $z = 3$ , por lo que el dato de incremento en la fosforilación tiene más fiabilidad. A este respecto, la aparición de péptidos iguales con distintos niveles de carga es relativamente frecuente, y aunque normalmente las variaciones en los niveles de fosforilación que se observan en ellos son similares, en algunas ocasiones pueden ser distintas. Hasta el momento no hay ningún método válido y fiable para combinar los niveles de todos los péptidos equivalentes, por lo que la única aproximación para ponderar estos datos es observar los niveles relativos de cada uno de ellos.



**Figura 72. Representación esquemática de la localización de los sitios de fosforilación de hERG detectados mediante el análisis fosfoproteómico de células HEK-H36/T1 tratadas o no con TRH. Se muestra en la figura**

#### 4. Resultados.

un esquema de hERG sobre el que se indican como círculos los sitios de fosforilación identificados. Los sitios cuyo nivel de fosforilación varía en respuesta a la TRH se resaltan en color rojo en la imagen.

La comparación entre los fosfositos identificados en los apartados a y b de la Tabla XVI indica que sólo la S243 identificado a partir de los inmunoprecipitados no ha sido identificado a partir de los extractos, quizás debido a su vecindad con un sitio de corte por tripsina. Respecto a las distintas variaciones observadas en a y b en respuesta a la TRH, se deben con toda probabilidad a que los datos de a provienen de un único experimento y no tienen fiabilidad estadística. Es interesante comentar que de los 14 sitios de fosforilación encontrados a lo largo de la secuencia de hERG, los residuos S283 y S1137 han sido descritos previamente como sitios consenso de fosforilación (Cui *et al.* 2000). Por su parte, los residuos S239 y S871 se encuentran en una secuencia consenso de fosforilación por MAPK (Jacobs *et al.* 1999; Sharrocks *et al.* 2000; Zhou *et al.* 2006). Además se han encontrado dos sitios (S250 y S261) cuya fosforilación no había sido descrita hasta el momento.

#### 4.4.4. Mutación de los sitios de fosforilación de hERG y su efecto en las características funcionales del canal y en la respuesta de éste a la TRH.

Tras localizar múltiples sitios de fosforilación en hERG y constatar que algunos de ellos parecen sufrir cambios en sus niveles de fosforilación tras un tratamiento con TRH, pasamos a estudiar si estos fosfositos, y en especial los segundos, podían tener algún papel en la modulación por la hormona de la corriente hERG. Para ello se generaron mutantes puntuales afectando a uno o varios de los sitios de fosforilación (ver Métodos), sustituyendo la serina fosforilable o bien por alanina, un aminoácido no cargado y no fosforilable, o por ácido aspártico, un aminoácido con carga negativa y que por tanto desarrolla un efecto fosfomimético al de una serina fosforilada (Wagner *et al.* 2004). En una primera aproximación, se introdujeron mutaciones de forma tanto individual como combinada en las serinas S239, S243, S261, S263, S264, S351, S354 y S1137 y en la treonina T353. Se decidió mutar esta última a pesar de no haberse detectado en los experimentos de espectrometría de masas, dado que en el fosfopéptido en el que se detectó la doble fosforilación de S351 y S354 fue difícil identificar con precisión la posición exacta de los residuos fosforilados. Por ello, y para asegurar la mutación de todos los posibles sitios de fosforilación presentes en esa zona, se decidió añadir también la T353. Tras coexpresar todas estas construcciones con el receptor de TRH en oocitos de *Xenopus*, se observó que los efectos de la hormona, tanto en la dependencia de voltaje de activación como en la velocidad de dicha activación y en la cinética de cierre del canal,

permanecían totalmente inalterados en los canales mutantes sin residuos fosforilables (F. Barros, resultados no mostrados). Para comprobar si este hecho era solamente debido a la utilización de los oocitos como sistema de expresión, estudiamos el efecto de las mutaciones en la respuesta de los canales a la TRH usando células HEK-T2, una variante obtenida en nuestro laboratorio de las células HEK293, que expresan de forma constitutiva el receptor de TRH (Giráldez, Tesis Doctoral 2001; Gómez-Varela *et al.* 2003b). Para estos estudios, las células se transfectaron con 3 µg por placa de plásmido pcDNA3B conteniendo la secuencia codificante del canal hERG mutante portando las serinas sustituidas que se indican en cada caso. La relación de las construcciones utilizadas en la que se detallan los sitios de fosforilación portando las mutaciones se resume en la

Tabla XVII. Las características funcionales basales de los canales y el efecto de la TRH sobre ellas fueron comparados en dichas células transfectadas tanto con canales normales como mutantes, prestando especial atención a aquellas construcciones carentes de las serinas S239 y S1137, cuyo nivel de fosforilación variaba tras el tratamiento con la hormona según los experimentos de fosfoproteómica cuantitativa (

Tabla XVI).

Mutante	Sitios de Fosforilación mutados
<b>hERG SA4</b>	S239A y S243A
<b>hERG SA1</b>	S261A, S263A y S264A
<b>hERG S1137A</b>	S1137A
<b>hERG S1137D</b>	S1137D
<b>hERG SA8</b>	S239A, S243A, S261A, S263A, S264A, S351A, T353A y S354A
<b>hERG SA9</b>	S239A, S243A, S261A, S263A, S264A, S351A, T353A, S354A y S1137A

**Tabla XVII. Relación de las construcciones mutantes del canal hERG, con los fosfositos mutados en cada caso.** Se muestran los mutantes de hERG utilizados para el análisis de sus características electrofisiológicas y su respuesta a TRH, indicando las posiciones en las que las serinas (S) o treoninas (T) han sido mutadas a alanina (A) o ácido aspártico (D).

En lo que respecta al mutante SA4, que incluye la sustitución de la S239 por alanina, una posición en la cual se observó un intenso aumento de su fosforilación al tratar con TRH (ver Tabla XVI), el desplazamiento en la dependencia de voltaje de activación en respuesta a la hormona resultó ligeramente reducido ( $15,2 \pm 4,8$  mV en el mutante frente a los  $22,2 \pm 4,2$  mV en células control), pero esta reducción no llegó a ser estadísticamente significativa (Tabla



#### 4. Resultados.

XVIII). Además, dado que la dependencia de voltaje inicial de estos canales mutantes ya se encuentra *per se* ligeramente desplazada a la derecha ( $10 \pm 2,3$  mV de  $I/V_{50}$  frente a los  $-1,05 \pm 1,5$  mV en células portando el canal nativo), es posible que esta desviación pueda ser la causa de la ligera disminución en su desplazamiento subsiguiente hacia la derecha en respuesta a la TRH. Por otro lado, la inhibición de la corriente máxima de cola inducida por la hormona permaneció inalterada en el caso del mutante S4 ( $24,3 \pm 4,7$  % de reducción respecto al  $26 \pm 1,9$  % en las células control). Por tanto, aunque la mutación de los sitios de fosforilación S239 y S243 en el mutante SA4 puede causar una leve alteración en la dependencia de voltaje del canal en ausencia de TRH, la presencia de dicha mutación no impide la modulación ulterior de las características electrofisiológicas de hERG inducida por la TRH.

El segundo sitio de hERG cuya fosforilación resultó notablemente afectada por la TRH fue la S1137. En este caso generamos dos canales mutantes sustituyendo esta serina por alanina o ácido aspártico (mutantes hERG S1137A y hERG S1137D respectivamente). En lo que respecta al mutante S1137A, la dependencia de voltaje ( $I/V_{50}$ ) en ausencia de TRH se situó en  $6,34 \pm 2,3$  mV (

Figura 73), un valor de nuevo desplazado a la derecha respecto al canal nativo, aunque en menor medida que en el caso del mutante SA4. Por su parte, la TRH produjo una reducción de la corriente máxima de  $18,5 \pm 8,9$  %, que no es significativamente distinta de la causada por la TRH sobre los canales no mutados. A su vez, la TRH produjo un desplazamiento de la dependencia de voltaje de  $12,2 \pm 3,3$  mV  $n = 4$ , desde los  $6,34 \pm 2,3$  mV iniciales hasta los  $18,65 \pm 1,96$  mV tras la adición de la hormona, un valor de desplazamiento que tampoco resultó estadísticamente distinto del observado en los canales no mutados (Tabla XVIII).

Canal mutante	Reducción de la corriente inducida por la TRH (%)	$I/V_{50}$ (mV) sin TRH	$I/V_{50}$ (mV) con TRH	Desplazamiento de la $I/V_{50}$ inducido por la TRH (mV)
hERG WT $n = 5$	$26 \pm 1,9$	$-1,05 \pm 1,5$	$21,2 \pm 3,9$	$22,2 \pm 4,2$
hERG SA4 $n = 3$	$24,3 \pm 4,7$	<b><math>10 \pm 2,3</math> *</b>	$25,3 \pm 2,5$	$15,2 \pm 4,8$
hERG SA1 $n = 4$	$23,7 \pm 3,2$	<b><math>15,2 \pm 5</math> *</b>	$19,6 \pm 7$	<b><math>4,4 \pm 3,4</math> *</b>
hERG S1137A $n = 4$	$18,5 \pm 8,9$	<b><math>6,3 \pm 2,3</math> *</b>	$18,7 \pm 2$	$12,2 \pm 3,3$
hERG S1137D $n = 4$	<b><math>12,3 \pm 4,1</math> *</b>	$-8 \pm 3,9$	<b><math>6,6 \pm 3,8</math> *</b>	$14,6 \pm 0,7$
hERG SA8 $n = 10$	$21,7 \pm 3,4$	$11,4 \pm 4,6$	$19,7 \pm 2,9$	<b><math>8,4 \pm 3,2</math> *</b>
hERG SA9 $n = 7$	<b><math>13,5 \pm 3,1</math> *</b>	$-1,3 \pm 5$	$13,3 \pm 5,1$	$14,6 \pm 2,9$

**Tabla XVIII. Efecto de la mutación puntual en sitios de fosforilación de hERG sobre sus parámetros electrofisiológicos y la modulación de éstos por TRH.** Se muestran los resultados de las medidas electrofisiológicas sobre el canal nativo y los mutantes puntuales en los sitios de fosforilación. Se indican los

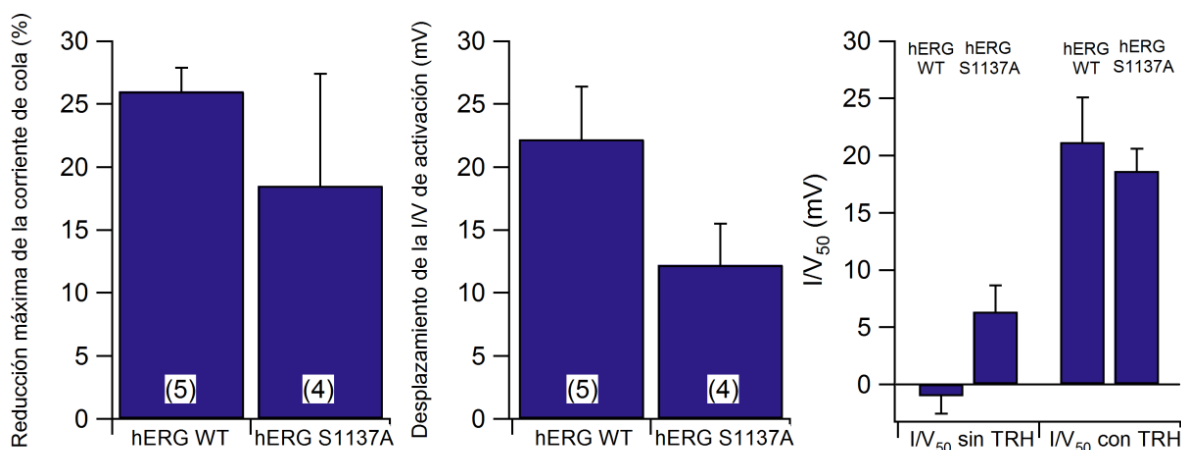
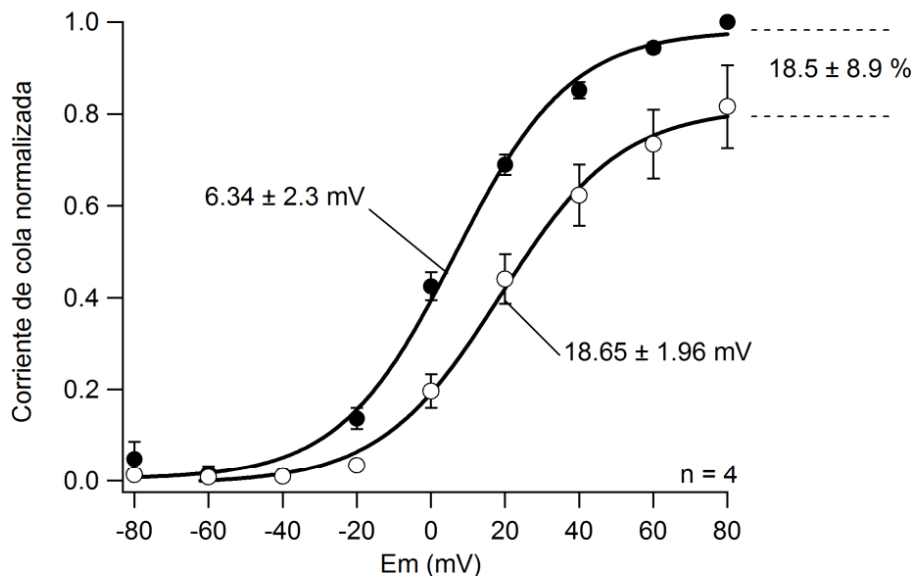
valores de reducción de la corriente máxima de cola inducida por TRH, la dependencia de voltaje de activación ( $I/V_{50}$ ) antes y después de añadir la hormona y el desplazamiento en dicha dependencia de voltaje inducido por la TRH. Se resaltan en **negrita** aquellos valores con una diferencia significativo respecto al canal no mutado (hERG WT). \*p-valor < 0,05.

En el caso del mutante S1137D, que porta una sustitución fosfomimética con el fin de simular los efectos de una fosforilación en la posición 1137, contrariamente a lo observado hasta ahora, la dependencia de voltaje del canal se encontraba desplazada hacia voltajes negativos, siendo la  $I/V_{50}$  en ausencia de hormona de  $-8 \pm 3,9$  mV (Tabla XVIII). Por su parte, la reducción de la corriente de cola por TRH en este mutante fue de un  $12,3 \pm 4,1$  %, un valor significativamente menor que el observado tras la adición de TRH a los canales hERG nativos ( $26 \pm 1,9$  %). Sin embargo, no se observó una reducción significativa del efecto de la TRH sobre el desplazamiento de la dependencia de voltaje, que fue de  $+14,6 \pm 0,7$  mV (desde  $-8 \pm 3,9$  mV de  $I/V_{50}$  hasta  $6,6 \pm 3,8$  mV) tras la adición de la hormona.

#### 4. Resultados.

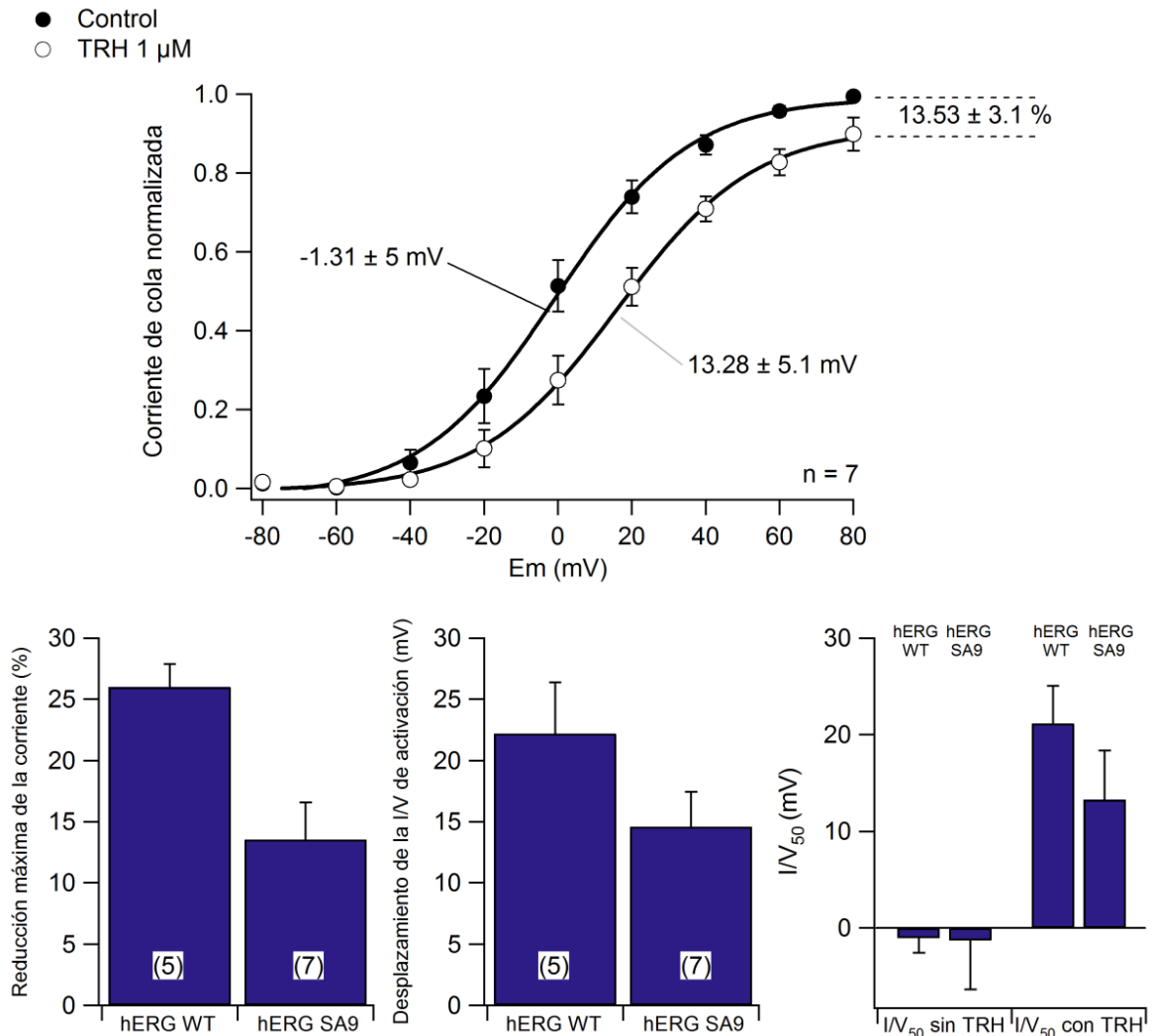
HEK T2 hERG S1137A

- Control
- TRH 1  $\mu$ M



**Figura 73. Caracterización electrofisiológica del mutante hERG S1137A y su respuesta a TRH en células HEK-T2.** En el panel superior se muestran las curvas corriente-voltaje para el mutante de hERG S1137A al principio del experimento (círculos negros) y después de la adición de 1  $\mu$ M de TRH (círculos blancos). Los símbolos representan la magnitud de la corriente de cola en el máximo en función del voltaje de despolarización aplicado. Los valores de corriente se presentan normalizados respecto a su valor máximo a voltajes positivos. Las líneas corresponden a las curvas de Boltzmann ( $h(V) = I_{max} [1/(1+e^{(V-V_{1/2})/k})]$ ) que mejor se ajustan a los datos. En las graficas de la parte inferior se indica la reducción del valor máximo de la corriente de cola inducida por TRH en canales hERG nativos (hERG WT) y en el canal mutante hERG S1137A (izquierda), el desplazamiento en la dependencia de voltaje inducido por la TRH en el canal nativo y en el canal mutante (centro) y los valores de  $I/V_{50}$  en el canal nativo y el mutante antes y después de la adición de TRH (derecha). En todos los casos se representan los valores medios  $\pm$  S.E.M., indicando en paréntesis el número de células estudiadas para cada condición.

HEK T2 hERG SA9 (S239A; S243A; S261A; S263A; S264A; S351A; T353A; S354A; S1137A)



**Figura 74. Caracterización electrofisiológica del mutante hERG SA9 y su respuesta a TRH en células HEK-T2.** En el panel superior se muestran las curvas corriente-voltaje para el mutante de hERG SA9 al principio del experimento (círculos negros) y después de la adición de TRH 1  $\mu$ M (círculos blancos). Los símbolos representan la magnitud de la corriente de cola en el máximo en función del voltaje de despolarización aplicado. Los valores de corriente se presentan normalizados respecto a su valor máximo a voltajes positivos. Las líneas corresponden a las curvas de Boltzmann ( $h(V) = I_{max} [1/(1+e^{(V-V_{1/2})/k})]$ ) que mejor se ajustan a los datos. En las graficas de la parte inferior se indica la reducción del valor máximo de la corriente de cola inducida por TRH en canales hERG nativos (hERG WT) y en el canal mutante hERG SA9 (izquierda), el desplazamiento en la dependencia de voltaje inducido por la TRH en el canal nativo y en el canal mutante (centro) y los valores de  $I/V_{50}$  en el canal nativo y el mutante antes y después de la adición de TRH (derecha). En todos los casos se representan los valores medios  $\pm$  S.E.M., indicando en paréntesis el número de células estudiadas para cada condición.

Finalmente, estudiamos el efecto de la mutación combinada de los 9 sitios de fosforilación de hERG (mutante SA9; Figura 74). En este caso, la dependencia de voltaje del mutante no apareció alterada respecto del control, siendo su  $I/V_{50}$  de  $-1,3 \pm 5$  mV. De nuevo, el efecto de la TRH sobre la reducción de la corriente máxima de cola resultó significativamente disminuido en este mutante múltiple ( $13,5 \pm 3,1$  %). Sin embargo, el efecto de la TRH sobre el desplazamiento de la dependencia de voltaje no se vio afectado de manera significativa por la

#### *4. Resultados.*

eliminación de los 9 sitios de fosforilación, desplazándose esta dependencia de voltaje  $14,6 \pm 2,86$  mV tras la adición de la TRH, desde los  $-1,3 \pm 5$  mV iniciales hasta los  $13,3 \pm 5,1$  mV en presencia de la hormona.

Así pues, parece que algunas de las mutaciones puntuales estudiadas pueden alterar las características electrofisiológicas del canal en cierta medida, afectando principalmente a la dependencia de voltaje de activación del mismo (Tabla XVIII). Sin embargo, la ausencia de serinas fosforilables en todos estos sitios mutados no modifica de forma significativa y sistemática la modulación de los parámetros cinéticos de hERG inducida por TRH. Por tanto, estas serinas no parecen ser necesarias para el efecto hormonal sobre el canal, lo que indicaría que la fosforilación de las mismas no es el mecanismo por el cual la hormona modula las características cinéticas de hERG.

## 5. Discusión.

## 5. *Discusión.*

La ruta de transducción de la señal desde el receptor de TRH hasta los canales de potasio *erg*, gracias a la cual la TRH causa efectos inhibitorios sobre esas corrientes, ha sido dilucidada parcialmente en nuestro laboratorio y en otros utilizando líneas celulares que expresan estos dos elementos bien de forma nativa (como las células GH<sub>3</sub>) o de forma heteróloga (como las células HEK293). A menudo, las cascadas de señalización se han estudiado usando diferentes tipos celulares, y el conocimiento obtenido se integra asumiendo que el tipo celular utilizado no es relevante para el funcionamiento de esa señalización. Sin embargo, diferentes tipos celulares pueden no responder de la misma manera ante el mismo estímulo, dado que pueden no tener la misma maquinaria celular básica y por tanto mostrar diferencias en sus dinámicas de transducción de señales (Selkirk *et al.* 2001; Zhang *et al.* 2009). De hecho, en nuestro laboratorio se ha comprobado que la transducción de señales entre el receptor de TRH y *erg* muestra diferencias notables entre las células GH<sub>3</sub> de adenohipófisis de rata y las células HEK-H36/T1 de riñón embrionario humano (Miranda *et al.* 2005). En esta Tesis Doctoral se pretenden estudiar algunos de los elementos implicados en la transducción de esa señal, e identificar posibles responsables de las diferencias entre las rutas que se activan en esos dos tipos celulares.

En primer lugar, para estudiar si el acoplamiento del receptor de TRH a la cascada de señalización puede ser uno de los motivos de esas diferencias, realizamos un estudio comparativo de la dependencia de la concentración de hormona en las respuestas de Ca<sup>2+</sup> y *erg* en células GH<sub>3</sub> y HEK-H36/T1. Los resultados obtenidos muestran que el efecto de liberación de Ca<sup>2+</sup> intracelular (Fase I de la respuesta a TRH) es similar en ambos tipos celulares (Figura 14 y Figura 15), mientras que el efecto de regulación del canal (perteneciente a la Fase II) muestra una clara diferencia, teniendo las células HEK-H36/T1 un EC<sub>50</sub> de activación seis veces menor que las GH<sub>3</sub> (Figura 18). Dado que en ambos tipos celulares se expresa el mismo receptor de TRH, esta diferencia solo puede ser debida o bien a la sobreexpresión del receptor en las células HEK-H36/T1 o a diferencias celulares ajenas al receptor mismo. Así, la menor EC<sub>50</sub> observada en las células HEK-H36/T1 podría deberse a que la sobreexpresión del receptor provoque la presencia de *spare receptors* o receptores de reserva; es decir, a que haya más receptores de los necesarios para alcanzar la respuesta máxima, lo cual permitiría que con una fracción menor de ellos activados se obtengan respuestas mayores. Además, la presencia de *spare receptors* tiene también el efecto de aumentar la cooperatividad de la respuesta, tal y como hemos observado en estas células en comparación con las GH<sub>3</sub> (Figura 18). Otra posibilidad es que los receptores se acoplen a proteínas G diferentes en función del tipo celular, lo cual explicaría los



## 5. Discusión.

diferentes mecanismos de regulación de los canales *erg*. De hecho, aunque para la mayoría de los sistemas de receptores la cantidad de proteína G disponible no es limitante, cuando se altera la estequiometría del sistema por sobreexpresión de los receptores la disponibilidad de proteína G sí puede ser una limitación, lo cual produciría una saturación de los mecanismos estímulo-respuesta e incluso el reclutamiento de otros elementos de respuesta celular (Kenakin 1997). De ahí que, ya sea mediante la activación de más de una subunidad  $\alpha$  de múltiples proteínas G o por un incremento significativo en el número de dímeros  $\beta/\gamma$ , la sobreexpresión del receptor pueda variar la respuesta observada a nivel de su acoplamiento a las rutas de transducción. No obstante, esto no explica por completo las diferencias observadas en nuestro caso, puesto que hemos comprobado que tras la sobreexpresión del receptor de TRH en las células GH<sub>3</sub> las características de la regulación hormonal de *erg* se mantienen inalteradas (Figura 19). Por tanto, las diferencias subyacentes entre estos dos tipos celulares estudiados no se deben exclusivamente a la cantidad de receptores que expresan ambos, sino que deben de implicar a otros factores involucrados en la transducción de la señal más allá del receptor.

Respecto al acoplamiento del receptor de TRH a proteínas G, mientras que el mecanismo de respuesta de la Fase I es bien conocido y se sabe que está mediado por  $G_{q/11}$  y PLC tanto en células GH<sub>3</sub> como en las HEK-H36/T1, la naturaleza de los elementos partícipes en la Fase II aún permanece desconocida en parte. En este sentido, en trabajos previos de nuestro laboratorio (Miranda *et al.* 2005) se describió que en las células GH<sub>3</sub> este acoplamiento tiene lugar con una proteína tipo  $G_s$  y que su acción se lleva a cabo a través de los dímeros  $\beta\gamma$  liberados por ésta. Sin embargo, (en las células HEK-H36/T1)  $G\alpha_s$  no está implicada en la regulación del canal hERG por TRH, y sin embargo se ha visto que dominantes negativos de  $G\alpha_{13}$  y Rho reducen el desplazamiento en la dependencia de voltaje de hERG inducido por TRH, mientras que  $G\alpha_t$  bloquea la inhibición de la corriente por TRH sin afectar a ese desplazamiento (Miranda *et al.* 2005). Para confirmar estas observaciones, en este trabajo, hemos usado los secuestradores de dímeros  $\beta\gamma$  fosducina y  $\beta$ ARK en células GH<sub>3</sub>, y hemos demostrado que son capaces de reducir la inhibición de los canales rERG por TRH, sin alterar la respuesta de liberación de  $Ca^{2+}$  intracelular dependiente de  $G_{q/11}$  y PLC que también provoca la hormona en estas células (Figura 20 y

Figura 22; Carretero *et al.* 2012). Sin embargo, ninguno de estos secuestradores de dímeros  $\beta\gamma$  es capaz de modificar la respuesta de los canales hERG a TRH en las células HEK-H36/T1 (Figura 21 y Carretero *et al.* 2012). Por tanto, el receptor de TRH se acopla a dos tipos de proteínas G, una de las cuales ( $G_{q/11}$ ) es común a los dos tipos celulares estudiados y está implicada en la

respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que la responsable del efecto sobre los canales *erg* es diferente en ambos tipos celulares. De este modo, aunque las rutas de señalización disparadas por la TRH en estas dos células utilicen elementos comunes, también incluyen elementos diferentes, que en todo caso son capaces de converger en el mismo efector, es decir, los canales *erg*.

Más abajo de las proteínas G en la ruta de transducción, uno de los elementos que se ha propuesto que interviene en la vía específica de modulación de estos canales por TRH en las células GH<sub>3</sub> es un evento de fosforilación/defosforilación (Barros *et al.* 1993; Gómez-Varela *et al.* 2003b). En este sentido, la implicación de algunas proteína quinasas como PKC y PKA ya ha sido descartada gracias al uso en este tipo celular de inhibidores y activadores de dichas quinasas. Sin embargo, en células CHO y HEK293 expresando hERG de forma heteróloga, se ha encontrado que las fosforilaciones por PKA o PKC son mecanismos reguladores de la actividad del canal, por ejemplo durante la respuesta adrenérgica cardíaca (Kiehn 2000; Cockerill *et al.* 2007; Li *et al.* 2008). En todo caso, la naturaleza de la(s) quinasa(s) responsable(s) del evento de fosforilación relacionado con la regulación de los canales *erg* por TRH permanece desconocida tanto en células GH<sub>3</sub> como en HEK-H36/T1. Uno de los principales objetivos de este trabajo ha sido el estudio de los procesos de fosforilación que tienen lugar en ambos tipos celulares en respuesta a TRH, para entre ellos identificar los responsables de la acción sobre los canales *erg*. Con ese objetivo, estudiamos primero posibles quinasas candidatas y luego los cambios generales en la fosforilación de las proteínas de esos tipos celulares.

De las posibles quinasas candidatas, la primera que consideramos fue PKB/Akt, ya que se había descrito que su actividad es necesaria para el correcto funcionamiento de los canales hERG expresados heterológamente en células HEK293, pues el bloqueo de su activación mediante wortmanina (un inhibidor de la PI3K) o el uso de dominantes negativos de Akt disminuyen la corriente basal mediada por el canal en estas células, mientras que una sobreexpresión de Akt la aumenta (Zhang *et al.* 2003). Sin embargo, no había datos acerca de la posible implicación de esta quinasa en la regulación hormonal de los canales *erg* en ningún tipo celular. De hecho, en nuestro laboratorio se ha visto que el tratamiento de células GH<sub>3</sub> con wortmanina (que bloquearía la activación de PKB/Akt, ver Figura 5) no produce ningún efecto sobre la respuesta de *erg* a TRH (Gómez-Varela *et al.* 2003b). No obstante, también se han descrito casos en los que Akt puede estar activa de forma independiente a PI3K (Song *et al.* 2005), por lo que nos pareció conveniente estudiar el efecto de una acción directa capaz de anular su actividad. Para estudiar si PKB/Akt está involucrada en la respuesta de *erg* a TRH utilizamos una estrategia de interferencia de RNA, usando mezclas de siRNAs dirigidos contra

## 5. Discusión.

zonas amplias de los mRNAs (de 817 pb para Akt1 humano y de 1068 pb para Akt1 de rata). Estas mezclas de siRNAs reducen eficientemente (en torno al 80 %) la expresión de Akt a nivel proteico en células HEK-H36/T1, no solo de la isoforma Akt1 que es la diana primaria, sino también de Akt2 y Akt3 que comparten un 71 % y un 82 % de identidad con Akt1 (Figura 23). La consecución de un nivel suficiente de silenciamiento, resultó claramente observable en células HEK-H36/T1 mediante análisis western, pero la baja transfectabilidad de las células GH<sub>3</sub> nos obligó a demostrar esa baja expresión mediante la selección de células transfectadas (Figura 31).

Usando la mezcla de siRNAs más efectiva de las dos preparadas para Akt1 humano pudimos comprobar que el silenciamiento de Akt impide la regulación por TRH de los canales hERG en células HEK-H36/T1. Así, los efectos de la TRH (reducción de un 30 – 40 % de la intensidad máxima de la corriente, desplazamiento de unos +20 mV en la dependencia de voltaje y casi un 40 % de aceleración de la caída de la corriente de cola) son reducidos en gran medida al silenciar Akt, especialmente el desplazamiento de la dependencia de voltaje y la aceleración de la caída de la corriente de cola (Figura 25 y Figura 26). Así pues, parece claro que en las células HEK-H36/T1 la quinasa PKB/Akt no es solo fundamental para el funcionamiento basal del canal, como ha sido mencionado previamente (Zhang *et al.* 2003), sino que además participa en la transducción de la señal desde el receptor de TRH hasta el canal hERG. Es interesante hacer notar que las células HEK-H36/T1 tratadas con las mezclas de siRNAs contra Akt mostraron densidades de corriente hERG significativamente menores que las células sin tratar, como demuestra la cuantificación realizada dividiendo la cantidad de corriente máxima por la capacidad de la membrana plasmática, un parámetro directamente proporcional a su superficie. Así, aparte de confirmar los datos previamente mencionados (Zhang *et al.* 2003), estos resultados aportan una prueba funcional adicional de que los siRNAs son capaces de bloquear de forma efectiva la presencia de Akt a nivel celular. A diferencia del claro efecto observado en las células HEK-H36/T1, en el caso de las células GH<sub>3</sub> transfectadas con una mezcla de siRNAs contra Akt1, observamos que no había un efecto apreciable de los mismos sobre la regulación por TRH, ya que en células tratadas con los siRNAs la hormona era capaz de reducir la magnitud de la corriente en torno a un 70 %, una disminución análoga a la observada en células sin tratar con ellos (Figura 32). Estos datos indican que en las células GH<sub>3</sub> la proteína Akt no interviene en la cascada de transducción de señales desde el receptor de TRH hasta el canal rERG.

Debido a la naturaleza de las mezclas de siRNAs (i.e. que están generadas a partir de amplias zonas de los cDNAs), no se podía descartar totalmente que en las condiciones estudiadas se pudiera estar produciendo algún efecto inespecífico *off-target* sobre la expresión de algún gen homología parcial o total con alguno de los siRNAs generados. Por lo tanto, para verificar de forma fiable el efecto del bloqueo de la expresión de Akt sobre la respuesta a la TRH, también diseñamos y usamos siRNAs dirigidos contra secuencias específicas de Akt1 humano o de rata. Los resultados obtenidos con estos siRNAs específicos en ambos tipos celulares confirmaron los observados con las mezclas, reduciendo el efecto modulador de TRH sobre hERG en HEK-H36/T1 (Figura 28 y Figura 29) y no mostrando efecto alguno sobre la modulación de rERG en las células GH<sub>3</sub> (

Figura 34). Una confirmación adicional de estos resultados se consiguió mediante un tratamiento con insulina durante 15 min, que previsiblemente produce el agotamiento de la ruta de PI3K-Akt. Tras este tratamiento se observa un bloqueo del efecto de la TRH en células HEK-H36/T1, pero no en las células GH<sub>3</sub> (

Figura 35 y

Figura 36). Todos estos datos nos permiten afirmar pues que la proteína Akt es necesaria para la trasducción de la señal desde el receptor de TRH hasta el canal hERG en las células HEK-H36/T1, pero que no está implicada en el proceso de señalización correspondiente en las células nativas GH<sub>3</sub>. Ello pone de relevancia la importancia del tipo celular utilizado a la hora de estudiar los sistemas de transducción de señales (y posiblemente otros sistemas con múltiples interacciones funcionales), ya que se pueden obtener conclusiones erróneas en casos de contextos celulares con diferentes patrones de expresión de las proteínas implicadas.

En cuanto al mecanismo mediante el cual se produce esta intervención de Akt, sorprendentemente parece no ser dependiente de su activación por fosforilación, ya que el tratamiento con TRH no produce variación (ni aumento ni disminución) en los niveles de fosforilación de Akt en la Ser473 responsable de su activación (Manning y Cantley 2007), en ninguno de los dos tipos celulares estudiados (

Figura 37 y Figura 38). Sin embargo, hay que destacar la existencia de niveles relativamente elevados de fosforilación de Akt de células en condiciones control. Por tanto, parece que la participación de Akt en la regulación hormonal de los canales hERG por TRH en las células HEK-H36/T1 no depende de la activación de su actividad quinasa, sino del mantenimiento de unos niveles de actividad enzimática basal, o bien de alguna interacción de la proteína con otros elementos de la cascada de señalización, que serían necesarios para la correcta regulación

## 5. Discusión.

hormonal por TRH del mismo. En este sentido, el efecto bloqueante de la respuesta hormonal producido por tratamientos largos con insulina parece no estar provocado por la activación crónica de Akt por la misma, sino más bien por el secuestro de algún componente común de la ruta.

Durante la búsqueda de posibles proteína quinasas candidatas, llamó nuestra atención por sus características la denominada PASK (Schläfli *et al.* 2009), por lo que también analizamos su posible implicación en la cascada de señalización desde el receptor de TRH a los canales *erg*. Esta proteína tiene un dominio PAS análogo al de *erg* de unión a otras proteínas con PAS (Schläfli *et al.* 2009), y se ha demostrado que el dominio PAS de *erg* es fundamental para su correcta función (Morais-Cabral *et al.* 1998). Por tanto, PASK podría interactuar con *erg* a través de sus dominios PAS, y ser responsable de alguno de los procesos de fosforilación implicados en la regulación por la TRH, incluyendo quizás la propia fosforilación del canal. De hecho, existen datos que podrían sugerir una fosforilación de hERG mediada por PASK (Schläfli *et al.* 2011). Para dilucidar si esta quinasa estaba o no implicada en la acción de la TRH seguimos la misma estrategia que en el caso de Akt, sintetizando mezclas de siRNAs que fueran capaces de silenciar la proteína quinasa PASK. Dado que no disponíamos de anticuerpos anti-PASK, se comprobó su correcto silenciamiento en ambos tipos celulares a nivel de mRNA (Figura 39). Tras los ensayos electrofisiológicos, se encontró que el silenciamiento de PASK no reducía el efecto modulador de la TRH sobre *erg* en ninguno de los dos tipos celulares (Figura 40 y Figura 41), lo cual indica que esta proteína quinasa no es necesaria para la transmisión de la señal desde el receptor de TRH a los canales *erg* ni en el sistema nativo de las células GH<sub>3</sub> ni en el heterólogo de HEK-H36/T1.

La tercera proteína quinasa cuya implicación en la ruta TRH-*erg* decidimos estudiar mediante el bloqueo de su acción fue ERK1/2, el elemento clave de una de las rutas de MAP quinasas más importantes en señalización celular. Esta decisión estuvo impulsada por múltiples datos de distintos laboratorios que demostraron su activación por TRH en varios tipos celulares (Ohmichi *et al.* 1994; Palomero *et al.* 1998; Wang y Maurer 1999; Kanasaki *et al.* 1999). Por contra, estudios realizados tanto sobre los canales endógenos de las células GH<sub>3</sub> como sobre canales *erg* sobreexpresados en células GH<sub>3</sub>/B6, habían indicado que los efectos moduladores de la TRH permanecen prácticamente inalterados en presencia de PD98059, un inhibidor de la quinasa MEK activadora de ERK (Schledermann *et al.* 2001; Gómez-Varela *et al.* 2003b). No obstante, análisis de inhibidores realizados a posteriori demostraron que el efecto del PD98059

se ejerce principalmente sobre la MAPK p38 (Bain *et al.* 2007), por lo que decidimos estudiar también más a fondo la posible implicación de ERK1/2 en la regulación hormonal de *erg* por TRH.

Así, en primer lugar bloqueamos la expresión de ERK usando unas combinaciones comerciales de siRNAs específicos contra ERK1 o ERK2 humanos o de rata, cuya efectividad en nuestras condiciones experimentales evaluamos antes de su ensayo funcional (Figura 43 y Figura 44). Tras las medidas electrofisiológicas encontramos que el silenciamiento de estas quinasas no altera la respuesta de los canales hERG a TRH en las células HEK-H36/T1 (Figura 45), indicando que no están implicadas en la transducción de la señal de TRH a hERG en este tipo celular. Sin embargo, en las células GH<sub>3</sub> tanto el silenciamiento de ERK1 como el de ERK2 por siRNAs redujeron de forma drástica el efecto modulador de la corriente rERG por TRH (Figura 46). Aunque clásicamente se ha asumido que las isoformas ERK1 y ERK2 son funcionalmente equivalentes (Chen *et al.* 2001; Cargnello y Roux 2011), algunos trabajos han explorado la posibilidad de que presenten efectos complementarios o diferenciales (Vantaggiato *et al.* 2006). Aunque en nuestras condiciones ERK2 parece estar más fosforilada que ERK1 (si las afinidades de los anticuerpos son similares para las dos) tras el tratamiento con TRH (Figura 42), ambas sufren un aumento similar en su fosforilación (Tabla XII) y las dos son necesarias para la transducción de la señal a los canales *erg*. Esto sugiere que, o bien el silenciamiento de una de las dos reduce el nivel total de la actividad quinasa lo suficiente para impedir la transducción efectiva de la señal, o que ambas tienen un papel complementario en lugar de redundante en la transducción de esta señal en particular. Así pues, de nuevo comprobamos que hay una diferencia en las respuestas al mismo estímulo entre las células GH<sub>3</sub> y las HEK-H36/T1, de forma que en las primeras es ERK y en las segundas es Akt la quinasa necesaria en el proceso de transducción desde TRHR a *erg*. Además, mediante análisis western pudimos ver que el perfil de activación de ERK1/2 por TRH es muy diferente en ambos tipos celulares (Figura 42). Así, en las células HEK-H36/T1 hacen falta al menos 5 min de tratamiento para conseguir una activación de ERK1/2 por TRH, tras lo cual se mantiene a niveles muy elevados durante más de 15 min. Sin embargo, en las células GH<sub>3</sub> la fosforilación ERK1/2 ya se aprecia tras 1 min de tratamiento con TRH pero es transitoria, decayendo tras 10 min. Todo ello sugiere que la ruta de activación de ERK por TRH podría tener lugar por distintos mecanismos en ambos tipos celulares, y provocar a su vez la activación de rutas de transducción parcial o totalmente diferentes, solo una de las cuales (la de células GH<sub>3</sub>) desembocaría en la regulación de los canales *erg*.

## 5. Discusión.

La clara implicación de ERK1/2 en la regulación de *erg* por TRH en células GH<sub>3</sub> es contraria a evidencias anteriores de nuestro propio grupo en las que la inhibición de MEK mediante PD98059 no afectaba a tal regulación en el mismo tipo celular (Gómez-Varela *et al.* 2003). Así, para añadir un nivel adicional de comprobación, estudiamos en nuestras condiciones experimentales los efectos de PD98059 y otros inhibidores más eficaces de MEK (Bain *et al.* 2007; Lee y Duesbery 2010) sobre a la activación de ERK y la regulación de los canales *erg* por TRH. En células HEK-H36/T1, estos inhibidores afectan en mayor o menor medida a la propia corriente de hERG reduciéndola, algo frecuentemente descrito para otros agentes farmacológicos y estos canales (Thomas *et al.* 2004, 2006; Perry *et al.* 2010, Vanderberg *et al.* 2012). Este efecto es especialmente fuerte en el caso del inhibidor PD98059, que causa una inhibición cercana al 60 % (más del doble de la reducción de corriente inducida por la TRH en estas células), lo cual hace que las medidas con este inhibidor presenten notables dificultades técnicas. No obstante, los niveles de reducción de las corrientes de hERG ocasionados por el tratamiento con los inhibidores U0126 y PD184352 fueron mucho más reducidos, permitiéndonos medir con más confianza el efecto de la TRH. Además, este efecto de los inhibidores sobre hERG afecta solamente a la magnitud de la corriente de cola, permaneciendo en todos los casos inalterada su dependencia de voltaje. Así, se pudo comprobar que, tal y como cabía esperar, en las células HEK-H36/T1 la inhibición de MEK no altera la respuesta de hERG a TRH (

Figura 50). En las células GH<sub>3</sub>, el uso de los inhibidores de MEK también produce una reducción muy notable de las corrientes rERG, de modo que la cuantificación del efecto de la TRH presentaba nuevamente bastantes dificultades en los casos de PD98059 y PD184352 debido a la escasa corriente rERG remanente tras el tratamiento con ellos. Sin embargo, con el inhibidor U0126 a la concentración de 0,5  $\mu$ M (la más baja que aún bloqueaba la activación de ERK1 y ERK2 en el análisis western), había solo un  $10,5 \pm 9$  % de reducción de la corriente rERG, lo que nos permitió estudiar su acción sobre el efecto de la TRH (Figura 52 y Figura 51). En este caso la inhibición de MEK1/2 reduce drásticamente la modulación de la corriente rERG por TRH a niveles similares a los observados con los estudios de silenciamiento de ERK (Figura 53), lo cual apunta los datos de la implicación de ERK en este tipo celular, y además indica que para ella es necesaria la activación de ERK por medio de MEK1/2.

Por otra parte, nos preguntamos si la sola activación de ERK era capaz de provocar la inhibición de las corrientes rERG en células GH<sub>3</sub>, y encontramos que ese efecto no es de

carácter general sino específico de la respuesta a TRH, pues la adición a las células de EGF, un conocido activador de ERK1/2, no afecta a la corriente *erg* ni a su regulación por TRH (Figura 55). En este sentido, es importante destacar además que el análisis western de la activación de ERK por EGF presenta un perfil de activación muy diferente al observado con TRH (Figura 54), lo cual sugiere que la activación de ERK puede implicar distintos efectos adicionales según el estímulo que la cause. Tanto EGF como TRH activan múltiples cascadas de señalización, algunas de ellas comunes como ERK pero otras no, como en el caso de la activación de Akt/PKB por EGF pero no por TRH (Figura 37). Como en muchos tipos celulares, en las células adenohipofisarias la activación de la ruta de ERK es un punto en el que converge la acción de diferentes neuropéptidos y factores de crecimiento (Wang y Maurer 1999). Dado que se ha descrito la participación fundamental de los dímeros  $\beta/\gamma$  en la regulación de los canales rERG por TRH, el mecanismo por el cual ERK está implicada en esta cascada de señalización podría ser mediante una activación a través de MEK similar a la descrita para los receptores acoplados a  $G_i$  (Della Roca *et al.* 1997; Kranenburg *et al.* 1999), pero siendo en este caso los responsables de la transducción de la señal los dímeros  $\beta/\gamma$  acoplados a una proteína G del tipo  $G_s$ , de forma análoga a la activación de ERK1/2 independiente de PKC descrita en células COS-7 y mediada por dímeros  $\beta/\gamma$  (Palomero *et al.* 1998). Así, aunque la activación de ERK por la vía de MEK es necesaria para la regulación de la actividad de los canales rERG por la TRH, esta cascada de señalización debe de tener componentes específicos y diferentes a otras rutas de activación de ERK que no afecten a la regulación de los canales rERG. Los elementos que acoplan específicamente la modulación de rERG por TRH a través de la activación de ERK son hasta el momento desconocidos. Uno de los posibles mecanismos para desarrollar esta especificidad es la implicación de determinadas proteínas *scaffold* o de andamiaje, que dirigen y acotan la activación de ERK1/2 en otros casos (Claperon y Therrien 2007; Good *et al.* 2009). En este sentido, es interesante considerar que un fosfopéptido de la Intersectina-1, una proteína adaptadora involucrada en endocitosis que participa en la regulación de la eficiencia y la especificidad de diversas rutas de señalización entre las que se incluye la de ERK/MAPK (Tsyba *et al.* 2011), es el que sufre un mayor aumento de la fosforilación en respuesta a TRH en los experimentos de fosfoproteómica cuantitativa en células GH<sub>3</sub> (Tabla XII). Ese aumento podría estar relacionado con una hipotética intervención de la Intersectina en la activación de ERK1/2 en células GH<sub>3</sub>, de forma que permita su



## 5. Discusión.

participación en la ruta de transducción desde TRHR a rERG en esas células, pero no en las HEK-H36/T1.

Además de la posible implicación de quinasas específicas, estudiamos mediante distintas técnicas proteómicas el conjunto de los cambios en fosforilación asociados a la respuesta a TRH, con el fin de identificar proteínas diana responsables de la transducción de señales en la modulación de los canales *erg*. Así, en este trabajo se presentan por primera vez estudios proteómicos y fosfoproteómicos de la respuesta a TRH en células GH<sub>3</sub> y HEK-H36/T1, un tipo de enfoque que salvo el análisis por electroforesis bidimensional en células GH4C1 (Akita *et al.* 2000), no había sido previamente realizado para esa hormona. Nuestra primera aproximación fue estudiar los cambios en el perfil de 2D-PAGE inducidos por el tratamiento con TRH, utilizando para ello detección con tinciones fluorescentes de proteína total (SYPRO) o fosfoespecíficas (Pro-Q), que permiten visualizar dichas variaciones y recoger las manchas o *spots* de interés para posteriormente identificarlas mediante MALDI-ToF (

Figura 56). Al comparar el conjunto de la respuesta a TRH tiñendo los geles de los dos tipos celulares con el colorante Pro-Q, pudimos ver algunos aspectos diferenciales. Mientras que en las ocho manchas en las que detectamos variación en las células HEK-H36/T1, ésta siempre se debió a un incremento en la fosforilación de las proteínas tras el tratamiento con TRH, de las doce manchas en las que apreciamos variación en las células GH<sub>3</sub>, ocho veían disminuida su señal y cuatro aumentada. Esto sugiere que hay diferencias entre ambos tipos celulares respecto al predominio a nivel general de los procesos de fosforilación y desfosforilación en respuesta a TRH, asociándose una mayor actividad quinasa a células HEK-H36/T1 y una mayor actividad fosfatasa a las GH<sub>3</sub> (

Figura 57 y Figura 58). Aunque con estos experimentos solo hemos identificado unos pocos cambios en proteínas concretas, estas diferencias generales son indicativas de que la respuesta a TRH es distinta en los dos tipos celulares, y se observan de forma consistente en los datos de fosfoproteómica cuantitativa que se comentarán más adelante. A pesar de la gran sensibilidad de las tinciones utilizadas y de que hemos conseguido observar unas cuantas variaciones en la movilidad electroforética en respuesta a TRH, obtuvimos escasos resultados en cuanto a la identificación de proteínas concretas en ambos tipos celulares, debido quizás a que las proteínas fosforiladas detectadas suponen un porcentaje bajo de las proteínas totales de la muestra (como se puede ver en la

Figura 56 al comparar la tinción fosfoespecífica Pro-Q con la tinción general SYPRO), lo cual dificulta su localización y aislamiento a partir del gel y la identificación posterior por MALDI-ToF (Tabla VI y Tabla VII).

Para mejorar el estudio e identificación de las proteínas fosforiladas realizamos un enriquecimiento en fosfoproteínas de los extractos celulares mediante columnas de afinidad, que resultó patente al aumentar el número de *spots* visualizados mediante la tinción Pro-Q. Al comparar con la tinción SYPRO se observó que el porcentaje de fosfoproteínas en la muestra era muy elevado, lo que indica la efectividad del enriquecimiento en ambos tipos celulares (Figura 59 y Figura 60). A pesar de ello, no conseguimos una mejora notable respecto a la identificación de proteínas en ninguno de los dos tipos celulares. Así, solo vimos cinco manchas diferenciales en las células HEK-H36/T1, que no se pudieron identificar con valores significativos. En las GH<sub>3</sub> se detectaron diferencias en quince proteínas, tres de las cuales tenían fosforilación disminuida y doce aumentada; de todas ellas, sólo tres proteínas pudieron ser identificadas (Tabla VIII y Tabla IX). El hecho de que, a diferencia de lo afirmado en el párrafo anterior, en este caso identificáramos mayoritariamente proteínas con aumento de fosforilación en células GH<sub>3</sub>, se debe posiblemente a que, al enriquecer la muestra en fosfoproteínas, se puede enmascarar la presencia de aquellas con niveles de fosforilación medios/bajos en el control y que resulten aún menores tras el tratamiento con TRH. En todo caso, la mayoría de las proteínas identificadas mediante estos análisis son proteínas de función estructural o chaperonas, algunas de las cuales están relacionadas con mecanismos de respuesta a TRH, como la Tubulina o la proteína Hsp90 (Ravindra *et al.* 1995; Iwabuchi *et al.* 2000) En conjunto, el principal problema que presentó la utilización de estas técnicas radica en la escasa capacidad de detección e identificación de las manchas proteicas de interés mediante el sistema MALDI-ToF, que unido a la limitación que supone la poco eficaz identificación visual de diferencias entre los geles bidimensionales de muestras control y con TRH, desemboca en los pobres resultados obtenidos mediante estos abordajes experimentales.

Así, para mejorar los sistemas de detección, identificación y cuantificación de fosfoproteínas decidimos realizar un abordaje experimental alternativo mediante una tecnología más efectiva, que implica estudios de fosfoproteómica con extractos enriquecidos en fosfopéptidos, analizados mediante espectrometría de masas cuantitativa LC-MS/MS. La espectrometría de masas cuantitativa “sin etiquetas” o *label-free* (Montoya *et al.* 2011; Casado y Cutillas 2011; Beltrán y Cutillas 2012) permite realizar el análisis partiendo de extractos

## 5. Discusión.

complejos y hacer replicados, lo cual permite en la detección de un mayor porcentaje del fosfoproteoma y reduce la variación experimental (Mann *et al.* 2002; Washburn *et al.* 2003). Mediante el uso de esta técnica conseguimos una gran mejora en la detección de proteínas fosforiladas, ya que pudimos identificar 2494 fosfopéptidos diferentes en las células HEK-H36/T1, de los cuales 308, correspondientes a 261 proteínas diferentes, tenían unos valores de fosforilación significativos. En cuanto a las células GH<sub>3</sub>, identificamos 1463 fosfopéptidos, 126 de los cuales, correspondientes a 98 proteínas diferentes, tenían niveles de fosforilación significativos. Es decir, mediante esta técnica se consiguió aumentar muchas veces la capacidad de detección de proteínas fosforiladas, y superar por tanto una de las trabas que presentaba la metodología anterior. En cuanto a las variaciones observadas entre células tratadas o no con TRH, 93 proteínas de HEK-H36/T1 tenían un incremento en sus niveles de fosforilación tras el tratamiento con TRH, mientras que otras 72 tenían una fosforilación disminuida (Tabla XI), valores que representan el 35,6 y el 27,6 % respectivamente de las proteínas identificadas. En cuanto a las células GH<sub>3</sub>, en respuesta a TRH se produce un aumento en la fosforilación de 25 proteínas (25,5 %) y una disminución en otras 50 (51,0 %) (Tabla XII). Así, como habíamos visto anteriormente, la TRH favorece la actividad quinasa en células HEK-H36/T1 y la actividad fosfatasa en células GH<sub>3</sub>. Esta diferencia a nivel general es un indicador de que la respuesta a TRH tiene lugar (al menos en parte) a través de diferentes efectores en los dos tipos celulares. De las proteínas identificadas, nos interesaron especialmente aquellas que pudieran estar implicadas en la regulación de los canales *erg*, y más especialmente las que participan en procesos de fosforilación y desfosforilación, es decir quinasas y fosfatasas de proteínas.

Respecto a las proteína quinasas, en HEK-H36/T1 destacan sobre todas las demás ERK1 y ERK2, cuyas fosforilaciones en los residuos involucrados en su activación se encuentran aumentadas 19 y 37 veces respectivamente. Además hay otras quinasas como la p90RSK1, una de las principales quinasas efectoras de ERK1/2, que tras el tratamiento con TRH aumenta su fosforilación 19 veces en el residuo Thr733, un proceso clave entre las múltiples fosforilaciones implicadas en la activación de la quinasa (Dalby *et al.* 1998). También es digna de mención CDK12, cuya fosforilación aumenta casi 4 veces, que ha sido implicada en la regulación de ERK1/2 en procesos de señalización por estrógenos (Iorns *et al.* 2009). Asimismo hemos observado un incremento de 2,5 veces en los niveles de fosforilación de la tirosina fosfatasa PTPN2. Por otra parte, tras el tratamiento con TRH hemos constatado una reducción a menos de la mitad en los niveles de fosforilación en la proteína MAP3K2, también la reducción a un tercio de la fosforilación en ABL2 y, sobre todo, la drástica reducción (de 50 veces) de la PI4KA,

responsable de la generación del segundo mensajero  $IP_3$  (Tabla XI b). Todas estas proteínas pertenecen a rutas de transducción de señales, pero no tenemos datos de su posible implicación en nuestro sistema. En conjunto, estos datos indican que en estas células las quinasas que mayor fosforilación/activación sufren por el tratamiento con TRH son ERK1, ERK2 y p90RSK1, todas de la ruta de ERK, y sugieren que ese tratamiento podría desembocar en una fosforilación directa del canal. En ese sentido la próxima candidata a analizar debe ser la quinasa p90RSK1.

Al igual que en HEK-H36/T1, en las células  $GH_3$  la fosforilación de ERK1 y ERK2 en los residuos que producen su activación aumenta mucho en respuesta a TRH (16 y 15 veces respectivamente), todo lo cual concuerda con datos previos en los que se describe que la adición de TRH induce una activación de ERK tanto en células que expresan de forma nativa el receptor de TRH (como las  $GH_3$  y las  $GH_4C_1$ ), como en células HEK293 y CHO expresándolo de forma heteróloga (Omichi et al. 1994; Palomero *et al.* 1998; Kanasaki *et al.* 1999). Además, en las células  $GH_3$  también se produce en respuesta a TRH un incremento en la fosforilación en PRKD1 y de la Sinaptojanina, una inositol 5 fosfatasa que participa en procesos de endocitosis de receptores. Como se ha mencionado, en  $GH_3$  la TRH produce principalmente una disminución en los niveles de fosforilación, lo cual se manifiesta en quinasas como la Cdk9, cuya fosforilación en la Ser357 disminuye a más de la mitad. También se detectaron disminuciones similares en las quinasas Mark 2, Pi4K2A y niveles aún más reducidos de fosforilación de Pak1 y Eef2k (Tabla XII b). Por tanto, la actividad ERK es de nuevo la que sufre el mayor incremento en fosforilación/activación tras el tratamiento con TRH de células  $GH_3$ , que también provoca la fosforilación de al menos un elemento de control de la endocitosis de receptores (la Sinaptojanina), que es uno de los mecanismos descritos que intervienen en la activación de ERK por proteínas G (Waters *et al.* 2005).

Resulta interesante que de todas las fosfoproteínas cuya fosforilación varía en respuesta a TRH, solo hemos encontrado 19 que varíen simultáneamente en células  $GH_3$  y HEK-H36/T1 (Tabla XIII), siendo los casos más notables los ya comentados de ERK1 y ERK2. También se observa una fosforilación en ambos tipos celulares en la proteína MARCS, un sustrato de PKC cuya fosforilación en respuesta a TRH ha sido previamente descrita en células  $GH_4C_1$  (Akita *et al.* 2000). De hecho, se sabe que la PKC es activada por TRH en las células  $GH_3$  (Kiley *et al.* 1991; Akita *et al.* 1994), y que es necesaria para la recuperación del efecto regulador de la TRH sobre *erg* en dichas células (Gómez-Varela *et al.* 2003b), aunque no para la modulación de *erg* en sí misma (Bauer *et al.* 1990, 1999; Barros *et al.* 1992, 1993; Schäfer *et al.* 1999; Schledermann *et*

## 5. Discusión.

al. 2001). Además, la activación de PKC es una de las rutas de señalización que desencadenan la activación de ERK1/2 (Omichi et al. 1994; Palomero et al. 1998; Kanasaki et al. 1999). Es importante señalar que los cambios en la fosforilación de estas 19 proteínas comunes a los dos tipos celulares no siempre son en el mismo sentido. Así, hay cambios paralelos en diez de ellas, de forma que cinco de ellas que presentan una fosforilación aumentada en ambos tipos celulares, y otras cinco una disminución. En las nueve restantes se producen respuestas contrarias en ambos tipos celulares, incrementándose la fosforilación en HEK-H36/T1 y disminuyendo en GH<sub>3</sub> en siete de ellas, mientras que ocurre lo contrario en las otras dos. Así, de nuevo se observa una tendencia general de aumento de la fosforilación en células HEK-H36/T1 y de disminución en las GH<sub>3</sub>. El caso de la Estatmina 1 (STMN1), una proteína reguladora de la dinámica de los microtúbulos, es especialmente interesante. Así, en HEK-H36/T1 se detecta principalmente el aumento de fosforilación en la Ser16 regulada por DOCK7, lo que inhibe su actividad desestabilizante de los microtúbulos (Watabe-Uchida et al. 2006), mientras que en GH<sub>3</sub> se detecta principalmente una disminución en los niveles de fosforilación de las Ser38 y Ser63 mediadas por CDK1 y PKA respectivamente, lo cual aumenta su unión a los microtúbulos facilitando la desestabilización de estos (Steinmetz et al. 2001). Es decir, que en cada una de estas líneas celulares la respuesta que desarrolla la Estatmina a la TRH es diferente, aumentando o disminuyendo la fosforilación y desencadenando además respuestas contrarias en cada caso. Este es otro dato que pone de relieve la observación de que diferentes líneas celulares pueden desarrollar diferentes respuestas frente a un mismo estímulo, y que estas respuestas pueden estar mediadas por diferentes mecanismos transductores o efectores en función del tipo celular.

Por los datos del análisis fosfoproteómico que hemos presentado, el efecto de fosforilación más notable que ejerce la TRH en ambos tipos celulares es el que provoca la activación de ERK1 y ERK2. Aunque en estudios previos se había descartado su implicación en la modulación de *erg* en las células GH<sub>3</sub>, en este trabajo hemos demostrado su implicación en la transducción de la señal desde el receptor de TRH hasta los canales *erg* en las células GH<sub>3</sub> pero no en HEK-H36/T1. Sin embargo, mediante el mismo análisis, no hemos detectado cambios en el estado de fosforilación de la proteína quinasa Akt en ninguno de los tipos celulares, lo que está de acuerdo con los resultados de los análisis western de las

Figura 37 y Figura 38. Recuérdese que, a pesar de no sufrir un aumento en su fosforilación, esta quinasa está implicada en la regulación de los canales *erg* por TRH en las células HEK-H36/T1 pero no en GH<sub>3</sub>, probablemente mediante algún mecanismo independiente de su activación.

Todos estos datos nos indican que con la metodología de fosfoproteómica cuantitativa empleada podemos detectar efectivamente cambios en fosforilación que están teniendo lugar en respuesta a la TRH, pues muchos de ellos están validados por descripciones previas en la literatura o por otras evidencias experimentales. Hay que destacar que una limitación de estos estudios es que solo se detectan las variaciones en fosforilación de las proteínas. Por tanto, otras proteínas reguladoras que participen en las cascadas de señalización, pero en cuya activación no estén involucrados procesos de fosforilación (como por ejemplo las proteínas Ras o Raf; ver Cargnello y Roux 2011), no serán detectadas mediante estas técnicas. Por otra parte, como hemos visto en el caso de ERK en las células HEK-H36/T1, no siempre un aumento de la fosforilación/activación es indicativo de la implicación de un enzima en la ruta de transducción. Por tanto, para validar los datos obtenidos mediante fosfoproteómica hacen falta otros estudios específicos mediante el uso de inhibidores, siRNAs o dominantes negativos, como los que se han presentado aquí, con el fin de desentrañar la implicación o no de los diferentes componentes en las rutas específicas de transducción de señales.

Los análisis fosfoproteómicos también han sido aplicados con éxito para el estudio de la modulación por fosforilación directa de las proteínas de varios canales Kv (Cerdá y Trimmer 2010; Vacher y Trimmer 2011; Barros *et al.* 2012). Respecto a los canales *erg*, se ha encontrado que la fosforilación es un mecanismo poderoso en la regulación de sus corrientes, y varias quinasas y fosfatasas han sido implicadas en estos procesos (Barros *et al.* 2012). En algunos casos, la regulación es causada por la fosforilación directa de las subunidades  $\alpha$  de los propios canales *erg* (Thomas *et al.* 2003, 2004), y en otros casos el efecto recae sobre la fosforilación de una subunidad auxiliar (Cockerill *et al.* 2007) o de una proteína reguladora como la 14-3-3 (Kagan *et al.* 2002; Pongs y Schwarz 2010). Para dilucidar si en respuesta a TRH se producía una fosforilación directa de los canales *erg* o de alguna proteína auxiliar, constatamos en primer lugar la presencia de fosforilación en la proteína del canal mediante análisis con anticuerpos anti-fosfoserina o anti-fosfotreonina. En ambos casos se identificó una banda del tamaño correspondiente al canal (Figura 68 y Figura 69). La presencia de fosforilaciones en el canal concuerda también con el retraso en la migración observado al realizar análisis western tras SDS-PAGE en presencia de Fos-Tag (Figura 70). Hay que hacer notar que la fosforilación se presenta mayoritariamente en la banda de mayor tamaño de las dos observadas, que corresponde a la forma madura y N-glicosilada de *erg*, tal y como comprobamos en células GH<sub>3</sub> mediante un tratamiento con N-glicosidasa (Figura 69). Por otra parte, el nivel de las fosforilaciones detectadas en los análisis western no parece variar en respuesta a TRH (Figura

## 5. Discusión.

68 y Figura 69), aunque dado que el canal *erg* presenta múltiples sitios de fosforilación (Thomas *et al.* 2003, 2004), podría ser que el cambio en uno o unos pocos de ellos no sea suficiente para alterar los niveles de inmunodetección fosfoespecífica de la banda, de forma que quede enmascarado por la detección de otros sitios fosforilados. También podría ocurrir que haya cambios de distinto signo en la fosforilación de varios de ellos, compensando el aumento en algunos con la disminución en otros, lo cual haría que permaneciera más o menos invariable el nivel de fosforilación total del canal. Así, para tratar de observar esos posibles cambios, realizamos un análisis western tras electroforesis bidimensional, para separar las distintas formas del canal en función de su estado de fosforilación. Tanto en células GH<sub>3</sub> como en HEK-H36/T1 observamos cambios en el patrón de *spots* en respuesta al tratamiento con TRH, lo que indica cambios en el estado de fosforilación del canal, aunque dado el pobre enfoque que se consigue mediante 2D-PAGE de proteínas de gran tamaño y glicosiladas (Sondej *et al.* 2009) es difícil precisar el significado de estos cambios (Figura 71).

Usando las técnicas de fosfoproteómica cuantitativa mencionadas previamente para analizar fosfopéptidos obtenidos de inmunoprecipitados con anticuerpos anti-*erg* o de extractos celulares, pudimos identificar en las células HEK-H36/T1 varios sitios de fosforilación en hERG y cambios en sus niveles de fosforilación en respuesta a TRH (Tabla XVI). En el caso de las células GH<sub>3</sub>, el mismo abordaje experimental no permitió identificar ningún fosfopéptido correspondiente a rERG, ni en el análisis de la inmunoprecipitación ni en el análisis de los extractos enriquecidos en fosfopéptidos (Figura 67 y Tabla XV). En nuestra opinión, esto puede ser debido a los bajos niveles de expresión de los canales rERG en el sistema nativo GH<sub>3</sub>, que son muy inferiores a los existentes en células HEK-H36/T1 (Bauer *et al.* 1990; Miranda *et al.* 2005), y que hace que los fosfopéptidos obtenidos de su procesamiento resulten indetectables en nuestros análisis. Así pues, identificamos catorce sitios de fosforilación de hERG en las células HEK-H36/T1 (Figura 72), para dos de los cuales, Ser250 y Ser261, este trabajo presenta la primera evidencia de fosforilación. Algunos de los sitios tienen características interesantes, pues presentan una secuencia consenso para su fosforilación por varias quinasas: los sitios Ser283 y Ser1137 han sido descritos como sustratos de fosforilación por PKA (Thomas *et al.* 1999), los Ser250 y Ser354 tienen una secuencia consenso de fosforilación para PKC (Thomas *et al.* 2003, y Cockerill *et al.* 2007), y la Ser239 está en una región consenso de fosforilación por ERK (Sharrocks *et al.* 2000; Zhou *et al.* 2006). Con todo, lo más interesante es que en las células HEK-H36/T1 la TRH produce un cambio en los niveles de

fosforilación de hERG, pues la fosforilación de los residuos Ser239 y Ser1137 se ve aumentada de forma significativa en respuesta a TRH (4 y 18 veces respectivamente).

Para saber si estos cambios en los niveles de fosforilación de hERG en respuesta a TRH son o no responsables de la regulación de su actividad eléctrica por dicha hormona, estudiamos el efecto de la mutación de estos fosfositios sobre las corrientes hERG y su regulación hormonal. En casi todos los casos, la mutación a alanina de uno o varios sitios de fosforilación produjo un cierto desplazamiento hacia voltajes más positivos en la dependencia de voltaje de los canales hERG mutantes, lo cual podría influir en el hecho de que, en algunos de los casos, el posterior efecto de la TRH sobre la dependencia de voltaje resulte reducido. Es el caso de los mutantes SA1, SA4 y S1137A, cuya  $I/V_{50}$  se encuentra desplazada de forma significativa a la derecha (Tabla XVIII). En todo caso, la combinación de las mutaciones de todos los fosfositios en el mutante SA9 no sólo no altera la dependencia de voltaje del canal, sino que en este mutante múltiple la TRH produce un desplazamiento de esa dependencia similar al observado en los canales nativos (Figura 74 y Tabla XVIII). Por tanto, ni las mutaciones aisladas, ni su efecto combinado muestran un papel claro sobre la regulación del canal por TRH, y las disminuciones en el desplazamiento de la dependencia de voltaje inducido por ella parecen deberse más a una alteración en las características electrofisiológicas basales de los canales mutantes que a un bloqueo de la respuesta hormonal. Un caso a destacar es el de la mutación en la Ser1137, una posición cuyo estado de fosforilación varía mucho en respuesta a TRH en los análisis de espectrometría de masas. La sustitución de este aminoácido por alanina (S1137A) produjo un efecto similar al de las otras mutaciones estudiadas, generando una cierta alteración en la dependencia de voltaje del canal (Figura 73), mientras que la introducción de una sustitución fosfomimética (S1137D) indujo un desplazamiento de la dependencia de voltaje del canal mutante hacia voltajes más negativos y no afectó a su desplazamiento ulterior por TRH. En conjunto, ni mediante mutaciones individuales ni mediante la suma de hasta nueve mutaciones puntuales, se consiguieron cambios consistentes que reflejaran un bloqueo del efecto de la TRH sobre el canal, aunque algunas de las mutaciones producían variaciones significativas de su efecto sobre uno de los parámetros cinéticos estudiados (Tabla XVIII). Estos datos parecen indicar que, si bien las fosforilaciones de alguna de estas posiciones pueden ser importantes para determinar alguna de las características electrofisiológicas del canal, no son un elemento fundamental en su modulación por TRH, al menos en las células HEK-T2 en las que se han realizado estos experimentos. Dado que no se pudieron detectar fosfositios en el canal rERG de células GH<sub>3</sub>,



## 5. *Discusión.*

que hubieran servido de referencia de su estado en un sistema nativo, no podemos descartar tampoco que algunas de las características de fosforilación y sus variaciones por TRH observadas en los canales hERG de las células HEK-H36/T1 puedan ser debidos a la sobre-activación de la ruta de la TRH ocasionada por la sobreexpresión de su receptor en estas células. Ello podría alterar el comportamiento de algunos de los elementos de respuesta de la ruta (Kenakin 1997), lo que a su vez podría dar lugar a la sobreactivación de varias quinasas (ERK1/2 entre ellas), que pudiese propiciar cierta actividad inespecífica de las mismas que provocara acciones de fosforilación del canal independientes de la modulación de su actividad.

En resumen, con el trabajo realizado en el transcurso de esta Tesis Doctoral, hemos avanzado en el estudio de la regulación de los canales *erg* por la TRH, describiendo la implicación en ella de diferentes agentes de transducción, como los dímeros  $\beta/\gamma$  y las proteína quinasas ERK y Akt. Además, queremos destacar especialmente la diferente implicación de esos elementos en función del tipo celular estudiado, lo cual pone de manifiesto la existencia de diferencias y rutas alternativas en los mecanismos de señalización en distintos tipos celulares. Gracias a esos estudios hemos podido determinar la participación de la ruta de ERK en la transducción de la señal en células GH<sub>3</sub>. También hemos realizado por primera vez un estudio del efecto de la TRH sobre el fosfoproteoma de dos tipos celulares, describiendo los cambios en los niveles de fosforilación de múltiples proteínas en respuesta a esta hormona. Asimismo hemos estudiado la fosforilación del canal hERG identificando en él catorce sitios de fosforilación, de los cuales dos, Ser259 y Ser261, se describen por primera vez en este trabajo, y otros dos, Ser239 y Ser1137, se fosforilan intensamente en respuesta al tratamiento de células HEK-H36/T1 con TRH. No obstante, parece que ninguno de los fosfositos analizados funcionalmente mediante mutagénesis dirigida está directamente implicado en la regulación de hERG por dicha hormona.

## 6. Conclusiones.

## 6. Conclusiones.

- 1- Las diferencias observadas en la modulación hormonal por TRH de los canales *erg* de las células GH<sub>3</sub> y HEK-H36/T1 no se deben principalmente a las diferencias en los niveles de expresión del receptor de TRH en estos dos tipos celulares, sino a la participación de elementos diferentes en las cascadas de señalización de dicho receptor en función del tipo celular.
- 2- Los dímeros  $\beta/\gamma$  de proteínas G son necesarios para la trasducción de la señal desde el receptor de TRH a los canales *erg* en las células GH<sub>3</sub>, pero no en las células HEK-H36/T1. Estos dímeros tampoco intervienen en la respuesta de Ca<sup>2+</sup> disparada por dicha hormona en ninguno de estos tipos celulares.
- 3- La proteína quinasa PKB/Akt es necesaria para la transducción de la señal hormonal desde el receptor de TRH hasta los canales *erg* en el sistema de expresión heterólogo que son las células HEK-H36/T1, pero no en el sistema nativo que son las células GH<sub>3</sub>. Esta implicación es independiente de la activación de la quinasa por fosforilación.
- 4- La proteína quinasa PASK no está implicada en la modulación hormonal de los canales *erg* por TRH ni en las células GH<sub>3</sub> ni en las HEK-H36/T1.
- 5- La TRH produce una intensa activación por fosforilación de las MAP quinasas ERK1 y ERK2 tanto en las células GH<sub>3</sub> como en las HEK-H36/T1. Sin embargo, ERK1 y ERK2 solo son necesarias para la transducción de la señal desde el receptor de TRH hasta el canal rERG en células GH<sub>3</sub>, transducción que también implica la activación de ERK1/2 mediante la quinasa MEK.
- 6- La respuesta global de fosforilación al tratamiento con TRH es muy diferente entre las células GH<sub>3</sub> y HEK-H36/T1, habiéndose encontrado solo trece proteínas comunes en las que varía su estado de fosforilación. Además, la respuesta a la TRH en células GH<sub>3</sub> conlleva una disminución global en la fosforilación, mientras que en las células HEK-H36/T1 la respuesta global es de aumento.
- 7- Se han identificado catorce sitios de fosforilación en el canal hERG, dos de los cuales, la Ser250 y la Ser261 han sido descritos por primera vez en este trabajo. Además, en las células HEK-H36/T1, la TRH induce un aumento notable en la fosforilación de la Ser239 y la Ser1137.
- 8- Las mutaciones de los fosfositos detectados en hERG, por separado o en conjunto, provocan en algunos casos cambios en los parámetros electrofisiológicos de los canales mutantes, pero no eliminan la regulación funcional de éstos por TRH en células HEK-T2.

## 6. Conclusiones.

## 7. Conclusions.

## 7. Conclusions.

- 1- The differences observed in the hormonal modulation of *erg* channels by TRH in HEK-H36/T1 and GH<sub>3</sub> cells are not mainly due to differences in the expression levels of TRH receptor in these two cell types, but to the participation of different elements in the receptor signaling cascades depending on the cell type.
- 2- The G proteins  $\beta/\gamma$  dimers are necessary for the signal transduction from the TRH receptor to *erg* channels in GH<sub>3</sub> cells but not in HEK-H36/T1 cells. These dimers are also not involved in the Ca<sup>2+</sup> response triggered by the hormone in either of these cell types.
- 3- The protein kinase PKB/Akt is necessary for transduction of the hormonal signal from the TRH receptor to the *erg* channels in the heterologous expression system which HEK-H36/T1 cells are, but not in the GH<sub>3</sub> cells native system. This involvement is independent of the kinase activation through phosphorylation.
- 4- The protein kinase PASK is not involved in the TRH modulation of *erg* channels in GH<sub>3</sub> cells, neither in HEK-H36/T1 cells.
- 5- TRH produces a strong activation by phosphorylation of the MAP kinases ERK1 and ERK2 in both GH<sub>3</sub> and HEK-H36/T1 cells. However, ERK1 and ERK2 are only required for the signal transduction from the TRH receptor to the rERG channel in GH<sub>3</sub> cells, transduction that also requires ERK1/2 activation by the MEK kinase.
- 6- The overall phosphorylation response to TRH treatment is very different in GH<sub>3</sub> and HEK-H36/T1 cells, such that only thirteen common proteins that vary in their phosphorylation status have been found. Additionally, the TRH response of GH<sub>3</sub> cells involves an overall decrease in phosphorylation, while in HEK-H36/T1 cells such overall response is an increase.
- 7- Fourteen phosphorylation sites have been identified on the hERG channel, two of which, Ser250 and Ser261 have been described for the first time in this work. Also, in HEK-H36/T1 cells TRH induces a remarkable increase of phosphorylation in Ser239 and Ser1137.
- 8- Mutations of the phosphosites detected in hERG, either separately or combined, cause changes in the electrophysiological parameters in some mutant channels, but do not abrogate the channels modulation by TRH in HEK-T2 cells.



## 7. Conclusions.

**Bibliografía:**

## *Bibliografía.*

- Abbott G.W., Sesti F., Splawski I., Buck M.E., Lehmann M.H., Timothy K.W., Keating M.T., Goldstein S.A.** MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell* **97**: 175–187 (1999).
- Adams J.P., Anderson A.E., Varga A.W., Dineley K.T., Cook R.G., Pfaffinger P.J., Sweatt J.D.** The A-type potassium channel Kv4.2 is a substrate for the mitogen-activated protein kinase ERK. *J Neurochem* **75**: 2277–2287 (2000).
- Akita Y., Ohno S., Yajima Y., Konno Y., Saido T.C., Mizuno K., Chida K., Osada S., Kuroki T., Kawashima S., Suzuki K.** Overproduction of a Ca<sup>2+</sup>-independent protein kinase C isozyme, nPKC epsilon, increases the secretion of prolactin from thyrotropin-releasing hormone-stimulated rat pituitary GH4C1 cells. *J Biol Chem* **269**: 4653–4660 (1994).
- Akita Y., Kawasaki H., Ohno S., Suzuki K., Kawashima S.** Involvement of protein kinase C epsilon in thyrotropin-releasing hormone-stimulated phosphorylation of the myristoylated alanine-rich C kinase substrate in rat pituitary clonal cells. *Electrophoresis* **21**: 452–459 (2000).
- Alessi D.R., Andjelkovic M., Caudwell B., Cron P., Morrice N., Cohen P., Hemmings B.A.** Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *Embo J* **15**: 6541–6551 (1996)a.
- Alessi D.R., Caudwell F.B., Andjelkovic M., Hemmings B.A., Cohen P.** Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase. *FEBS Lett* **399**: 333–338 (1996)b.
- Alessi D.R., James S.R., Downes C.P., Holmes A.B., Gaffney P.R., Reese C.B., Cohen P.** Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol* **7**: 261–9 (1997).
- Alonso-Ron C., Barros F., Manso D. G., Gómez-Varela D., Miranda P., Carretero L., Domínguez P., de la Peña P.** Participation of HERG channel cytoplasmic structures on regulation by the G protein-coupled TRH receptor. *Pflugers Arch* **457**: 1237–1252 (2009).
- Amarzguioui M., Pryz H.** An algorithm for selection of functional siRNA sequences. *Biochem. Biophys. Res Commun* **316**: 1050–1058 (2004).
- Amarzguioui M., Lundberg P., Cantin E., Hagstrom J., Behlke M.A.** Rational design and *in vitro* and *in vivo* delivery of dicer substrate siRNA. *Nat Protocols* **1**: 508–517 (2006).
- Ambesajir A., Kaushik A., Kaushik J.J., Petros S.T.** RNA interference: A futuristic tool and its therapeutic applications. *Saudi J of Biol Sci* **19**: 395–403 (2012).
- Arcangeli A., Becchetti A., Mannini A., Mugnai G., De Filippi P., Tarone G., Del Bene M.R., Barletta E., Wanke E., Olivetto M.** Integrin-mediated neurite outgrowth in neuroblastoma cells depends on the activation of potassium channels. *J Cell Biol* **122**: 1131–1143 (1993).
- Arcangeli A., Bianchi L., Becchetti A., Faravelli L., Coronello M., Mini E., Olivetto M., Wanke E.** A novel inward-rectifying K<sup>+</sup> current with a cell cycle dependence governs the resting potential of mammalian neuroblastoma cells. *J Physiol* **489**: 455–471 (1995).
- Auguin D., Barthe P., Augé-Sénégas M.T., Stern M.H., Noguchi M., Roumestand C.** Solution structure and backbone dynamics of the pleckstrin homology domain of the human protein kinase B (PKB/Akt). Interaction with inositol phosphates. *J Biomol NMR*. **28**: 137–55 (2004).
- Bain J. Plater L., Elliott M., Shpiro N., Hastie C.J., Mclauchlan H., Klevernic I., Arthur J.S.C., Alessi D.R., Cohen P.** The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J* **408**: 297–315 (2007).
- Barros F., López-Briones L.G., Coca-Prados M., Belmonte C.** Detection and characterization of Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channels in transformed cells of human non-pigmented ciliary epithelium. *Curr Eye Res* **10**: 731–8 (1991).
- Barros F., Delgado L.M., Del Camino D. de la Peña P.** Characteristics and modulation by thyrotropin-releasing hormone of an inwardly rectifying K<sup>+</sup> current in patch-perforated GH3 anterior pituitary cells. *Pflugers Arch* **422**: 31–39 (1992).
- Barros F., Mieskes G., del Camino D., de la Peña P.** Protein phosphatase 2a reserves inhibition of inward rectifying K<sup>+</sup> currents Thyrotropin-Releasing hormone in GH<sub>3</sub> pituitary cells. *FEBS Lett* **336**: 433–439 (1993).
- Barros F., Villalobos C., García-Sancho J., del Camino D., de la Peña P.** The role of the inwardly rectifying K<sup>+</sup> current in resting potential and thyrotropin-releasing-hormone-induced changes in cell excitability of GH<sub>3</sub> rat anterior pituitary cells. *Pflugers Arch* **426**: 221–230 (1994).

## Bibliografía.

- Barros F., del Camino D., Pardo L.A., de la Peña P.** Caffeine enhancement of electrical activity through direct blockade of inward rectifying  $K^+$  currents in GH<sub>3</sub> rat anterior pituitary cells. *Pflügers Arch* **431**: 443-451 (1996).
- Barros F., del Camino D., Pardo L.A., Giráldez T., de la Peña P.** Demonstration of an inwardly rectifying K<sup>+</sup> current component modulated by TRH and caffeine in GH<sub>3</sub> rat anterior pituitary cells. *Pflügers Arch* **435**: 119-129 (1997).
- Barros F., Gómez-Varela D., Viloria C.G., Palomero T., Giráldez T., de la Peña P.** Modulation of human erg K<sup>+</sup> channel gating by activation of a G protein-coupled receptor and protein kinase. *C J Physiol* **511**: 333-346 (1998).
- Barros F., Domínguez P., de la Peña P.** Cytoplasmic domains and voltage-dependent potassium channel gating. *Front Pharmacol* **3**: 49 (2012).
- Bauer C.K., Meyerhof W., Schwarz J.R.** An inward-rectifying  $K^+$  current in clonal rat pituitary cells and its modulation by thyrotropin-releasing hormone. *J Physiol* **429**: 169-189 (1990).
- Bauer C.K., Davison I., Kubasov I., Schwarz J.R., Mason W.T.** Different G proteins are involved in the biphasic response of clonal rat pituitary cells to thyrotropin-releasing hormone. *Pflügers Arch* **428**: 17-25 (1994).
- Bauer C.K., Engeland B., Wulfsen I., Ludwig J., Pongs O., Schwarz J.R.** RERG is a molecular correlate of inward-rectifying K current in clonal rat pituitary cells. *Rec Chann* **6**: 19-29 (1998).
- Bauer C.K., Schafer R., Schiemann D., Reid G., Hanganu I., Schwarz J.R.** A functional role of the erg-like inward-rectifying  $K^+$  current in prolactin secretion from rat lactotrophs. *Mol Cell Endocrinol* **148**: 37-45 (1999).
- Bauer C.K., Wulfsen I., Schafer R., Glassmeier G., Wimmers S., Flitsch J., Ludecke D.K., Schwarz J.R.** HERG K(+) currents in human prolactin-secreting adenoma cells. *Pflügers Arch* **445**: 589-600 (2003).
- Baulcombe D.** RNA silencing. *TRENDS Biochem Sci* **30**: 290-293 (2005).
- Beitner-johnson D., LeRoith D.** Insulin-like growth factor-I stimulates tyrosine phosphorylation of endogenous c-Crk. *J Biol Chem* **270**: 5187-5190 (1995).
- Bellacosta A., Testa J.R., Moore R., Laure L.** A portrait of Akt kinases. *Cancer Biol Ther* **3**: 268-275 (2004).
- Beltrán L., Cutillas P.R.** Advances in phosphopeptide enrichment techniques for phosphoproteomics. *Amino Acids* **43(3)**: 1009-1024 (2012).
- Bian J.S., Cui J., McDonald T.V.** HERG K(+) channel activity is regulated by changes in phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate. *Circ Res* **89**: 1168-76 (2001).
- Bian J.S., Kagan A., McDonald T.V.** Molecular analysis of PIP2 regulation of HERG and IKr. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **287**: 2154-2163 (2004).
- Bian J.S., McDonald T.V.** Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate interactions with the HERG K(+) channel. *Pflügers Arch*. **455**: 105-113 (2007).
- Bianchi L., Wible B., Arcangeli A., Tagliatela M., Morra F., Castaldo P., Crociani O., Rosati B., Faravelli L., Olivetto M., Wanke E.** HERG encodes a  $K^+$  current highly conserved in tumors of different histogenesis: a selective advantage for cancer cells?. *Cancer Res* **58**: 815-822 (1998).
- Binggeli R. y Weinstein R.C.** Membrane potentials and sodium channels: hypotheses for growth regulation and cancer formation based on changes in sodium channels and gap junctions. *J Theor Biol* **123**: 377-401 (1986).
- Bjørø T., Sand O., Ostberg B.C., Gordeladze J.O., Torjesen P., Gautvik K.M., Haug E.** The mechanisms by which vasoactive intestinal peptide (VIP) and thyrotropin releasing hormone (TRH) stimulate prolactin release from pituitary cells. *Biosci Rep* **10**: 189-99 (1990).
- Blüml K., Schnepf W., Schröder S., Beyermann M., Macias M., Oschkinat H., Lohse M.J.** A small region in phosphodiesterase-3 inhibits G-protein betagamma-subunit function. *EMBO J* **16**: 4908-4915 (1997).
- Boulton T.G., Yancopoulos G.D., Gregory J.S., Slaughter C., Moomaw C., Hsu J., Cobb M.H.** An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science* **249**: 64-67 (1990).
- Boulton T.G., Nye S.H., Robbins D.J., Ip N.Y., Radziejewska E., Morgenbesser S.D., DePinho R.A., Panayotatos N., Cobb M.H., Yancopoulos G.D.** ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* **65**: 663-675 (1991).
- Brazil D.P., Hemmings B.A.** Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem Sci* **26**: 657-664 (2001).

- Carretero L., Barros F., Miranda P., Fernández-Trillo J., Machín A., de la Peña P., Domínguez P.** Cell type influences the molecular mechanisms involved in hormonal regulation of ERG K<sup>+</sup> channels. *Pflugers Arch* **463**: 685-702 (2012).
- Cargnello M., Roux P.P.** Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* **75**: 50-83 (2011).
- Casado P., Cutillas P.R.** A Self-validating Quantitative Mass Spectrometry Method for Assessing the Accuracy of High-content Phosphoproteomic Experiments. *Mol Cell Proteomics* **10**: M110.003079 (2011).
- Cayabyab F.S., Schlichter L.C.** Regulation of an ERG K<sup>+</sup> current by Src Tyrosine Kinase. *J Biol Chem* **277**: 13673–13681 (2002)a.
- Cayabyab F.S., Tsui F.W.L., Schlichter L.C.** Modulation of the ERG K<sup>+</sup> current by the Tyrosine Phosphatase, SHP-1. *J Biol Chem* **277**: 48130–48138 (2002)b.
- Cerdá O., Trimmer J.S.** Analysis and functional implications of phosphorylation of neuronal voltage-gated potassium channels. *Neurosci Lett* **486**: 60-7 (2010).
- Chen J., Zou A., Splawski I., Keating M.T., Sanguinetti M.C.** Long QT Syndrome-associated Mutations in the Per-Arnt-Sim (PAS) Domain of HERG Potassium Channels Accelerate Channel Deactivation. *J Biol Chem* **274**: 10113-10118 (1999).
- Chen Z., Gibson T.B., Robinson F., Silvestro L., Pearson G., Xu B. E., Wright A., Vanderbilt C., Cobb M.H.** MAP kinases. *Chem Rev* **101**: 2449–2476 (2001).
- Chernet B.T., Levin M.** Transmembrane voltage potential is an essential cellular parameter for the detection and control of tumor development in a *Xenopus* model. *Dis Model Mech* **6**: 595-607 (2013).
- Cherubini A., Taddei G.L., Crociani O., Paglierani M., Buccoliero A.M., Fontana L., Noci I., Borri I., Borrani E., Giachi M., Becchetti A., Rosati B., Wanke E., Olivotto M., Arcangeli A.** HERG potassium channels are more frequently expressed in human endometrial cancer as compared to non-cancerous endometrium. *Br J Cancer* **83**: 1722-1729 (2000).
- Claperon A. y Therrien M.** KSR and CNK: two scaffolds regulating RAS-mediated RAF activation. *Oncogene* **26**: 3143 - 3158 (2007).
- Cleland TA., Linster C.** Concentration tuning mediated by spare receptor capacity in olfactory sensory neurons: a theoretical study. *Neural Comput* **11**: 1673-1690. (1999).
- Cockerill S.L., Tobin A.B., Torrecilla I., Willars G.B., Standen N.B., Mitcheson J.S.** Modulation of hERG potassium currents in HEK-293 cells by protein kinase C. Evidence for direct phosphorylation of pore forming subunits. *J Physiol* 2007 **581**: 479-93 (2007).
- Corrette, B. J., Bauer, C. K., Schwarz J. R.** Electrophysiology of anterior pituitary cells. Electrophysiology of Neuroendocrine cells. Scherübl, H. & Hescheler, J. (eds) CRC Press Inc. 101-143 (1995).
- Coulombe P., Meloche S.** Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. *Biochem Biophys Acta* **1773**: 1376–1387 (2007).
- Crociani O., Guasti L., Balzi M., Becchetti A., Wanke E., Olivotto M., Wymore R.S., Arcangeli A.** Cell cycle-dependent expression of HERG1 and HERG1B isoforms in tumor cells. *J Biol Chem* **278**: 2947-2955 (2003).
- Cross D.A, Alessi D.R, Cohen P., Andjelkovich M., Hemmings B.A.** Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* **378**: 785-789 (1995).
- Cui J., Melman Y., Palma E., Fishman G.I., McDonald T.V.** Cyclic AMP regulates the HERG K<sup>+</sup> channel by dual pathways. *Curr Biol* **10**: 671-674 (2000).
- Cui J., Kagan A., Qin D., Mathew J., Melman Y., McDonald T.V.** Analysis of the cyclic nucleotide binding domain of the HERG potassium channel and interactions with KCNE2. *J Biol Chem* **276**: 17244-17451 (2001).
- Curran M.E., Splawski I., Timothy K.W., Vincent G.M., Green E.D., Keating M.T.** A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell* **80**: 795-803 (1995).
- Cutillas P.R., Vanhaesebroeck B.** Quantitative Profile of Five Murine Core Proteomes Using Label-free Functional Proteomics. *Mol Cell Proteomics* **6**: 1560-1573 (2007).
- Dalby K.N., Morrice N., Caudwell F.B., Avruch J., Cohen P.** Identification of Regulatory Phosphorylation Sites in Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK)-activated Protein Kinase-1a/p90<sup>rsk</sup> That Are Inducible by MAPK. *J Biol Chem* **273**: 1496-1505 (1998).

## Bibliografía.

- Davies S.P., Reddy H., Caivano M., Cohen P.** Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J.* **351**: 95-105 (2000).
- de la Peña P., Del Camino D., Pardo L.A., Domínguez P., Barros F.** Gs couples thyrotropin-releasing hormone receptors expressed in *Xenopus* oocytes to phospholipase C. *J Biol Chem* **270**: 3554-9 (1995).
- de la Peña P., Alonso-Ron C., Machín A., Fernández-Trillo J., Carretero L., Domínguez P., Barros F.** 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. *J Biol Chem* **286**: 19065-19075 (2011)
- Della Rocca G.J., van Biesen T., Daaka Y., Luttrell D.K., Luttrell L.M., Lefkowitz R.J.** Ras-dependent mitogen-activated protein kinase activation by G protein-coupled receptors. Convergence of G<sub>i</sub>- and G<sub>q</sub>-mediated pathways on calcium/calmodulin, Pyk2, and Src kinase. *J Biol Chem* **272**: 19125-19132 (1997).
- Dhillon A.S., Pollock C., Steen H., Shaw P.E., Mischak H., Kolch W.** Cyclic AMP-dependent kinase regulates Raf-1 kinase mainly by phosphorylation of serine 259. *Mol Cell Biol* **22**: 3237-3246 (2002).
- Dhillon A.S., Hagan S., Rath O., Kolch W.** MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* **26**: 3279-3290 (2007).
- Dioum E.M., Rutter J., Tuckerman J.R., Gonzalez G., Gilles-Gonzalez M.A., McKnight S.L.** NPAS2 a gas-responsive transcription factor. *Science* **298**: 2385-2387 (2002).
- Dohoon K. y Jongkyeong C.** Akt: versatile mediator of cell survival and beyond. *J Biochem Mol Biol* **35**: 106-115 (2002).
- Dong L.Q., Liu F.** PDK2: the missing piece in the receptor tyrosine kinase signaling pathway puzzle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **289**: 187-196 (2005).
- Eckhardt K., Tröger J., Reissmann J., Katchinski D.M., Wagner K.F., Stengel P., Paasch U., Hunziker P., Borter E., Barth S., Schlafli P., Spielmann P., Stiehl D.P., Camenisch G., Wenger R.H.** Male germ cell expression of the PAS domain kinase PASKIN and its novel target eukaryotic translation elongation factor eEF1A1. *Cell Physiol Biochem* **20**: 227-240 (2007).
- Elion E.A.** The Ste5p scaffold. *J Cell Sci* **114**: 3967-3978 (2001).
- Emmi A., Wenzel H.J., Schwartzkroin P.A., Tagliatela M., Castaldo P., Bianchi L., Nerbonne J., Robertson G.A., Janigro D.** Do glia have heart? Expression and functional role for ether-a-go-go currents in hippocampal astrocytes. *J Neurosci* **20**: 3915-3925 (2000).
- Faravelli L., Arcangeli A., Olivetto M., Wanke E.** A HERG-like K<sup>+</sup> channel in rat F-11 DRG cell line: pharmacological identification and biophysical characterization. *J Physiol* **496**: 13-23 (1996).
- Fayard E., Tintignac L.A., Baudry A., Hemmings B.A.** Protein kinase B/Akt at a glance. *J cell sci* **118**: 5675-5678 (2005).
- Fernández-Trillo J., Barros F., Machín A., Carretero L., Domínguez P., de la Peña P.** Molecular determinants of interactions between the N-Terminal Domain and the transmembrane core that modulate hERG K<sup>+</sup> channel gating. *Plos ONE* **6**: e24674 (2011).
- Ficker E., Dennis A.T., Wang L., Brown A.M.** Role of cytosolic chaperones Hsp70 and Hsp90 in maturation of the cardiac potassium channel HERG. *Circ Res* **92**: e87-100 (2003).
- Franke T.F.** PI3K/Akt: getting in right matters. *Oncogene* **27**: 6473-6488. (2008).
- Giráldez T.** Mecanismos de modulación de los canales *erg* y su relación con las variaciones de actividad eléctrica y Ca<sup>2+</sup> Intracelular en células adenohipofisarias. *Tesis doctoral*. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Oviedo (2001).
- Glassmeier G., Hempel K., Wulfsen I., Bauer C.K., Schumacher U., Schwarz J.R.** Inhibition of HERG1 K<sup>+</sup> channel protein expression decreases cell proliferation of human small cell lung cancer cells. *Pflugers Arch* **463**: 365-76 (2012).
- Goldsmith Z.G., Dhanasekaran D.N.** G protein regulation of MAPK networks. *Oncogene* **26**: 3122-3142 (2007).
- Gómez-Varela D., de la Peña P., Garcia J., Giraldez T., Barros F.** Influence of amino-terminal structures on kinetic transitions between several closed and open status in human *erg* K<sup>+</sup> channels. *J Membrane Biol* **187**: 117-133 (2002).
- Gómez-Varela D., Barros F., Viloria C.G., Giráldez T., Manso D.G., Dupuy S.G., Miranda P., de la Peña P.** 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 (2003)a.
- Gómez-Varela D., Giraldez T., de la Peña P., Dupuy S.G., García-Manso D., Barros F.** Protein kinase C is necessary for recovery from the thyrotropin-releasing hormone-induced *r-ERG* current reduction in GH<sub>3</sub> rat anterior pituitary cells. *J Physiol* **547**: 913 - 929 (2003)b.
- Gong Q., Anderson C.L., January C.T., Zhou Z.** Role of glycosylation in cell surface expression and stability of HERG potassium channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**: 77 - 84 (2002).
- Gong Q., Keenedy D.R., Molinari M., Zhou Z.** Degradation of trafficking-defective long QT syndrome type II mutant channels by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* **280**: 19419 - 19425 (2005).
- Good M., Tang G., Singleton J., Remenyi A., Lim W. A.** The Ste5 scaffold directs mating signaling by catalytically unlocking the Fus3 MAP kinase for activation. *Cell* **136**: 1085 - 1097 (2009).
- Gschwind A., Zwick E., Prenzel N., Leserer M., Ullrich A.** Cell communication networks: epidermal growth factor receptor transactivation as the paradigm for the inter-receptor signal transmission. *Oncogene* **20**: 1594 - 1600 (2001).
- Gullo F., Ales E., Rosati B., Lecchi M., Masi A., Guasti L., Cano-Abad M.F., Arcangeli A., Lopez M.G., Wanke E.** ERG K<sup>+</sup> channel blockade enhances firing and epinephrine secretion in rat chromaffin cells: the missing link to LQT2-related sudden death?. *FASEB J* **17**: 330 - 332 (2003).
- Guo F.F., Kumahara E., Saffen D.** A CalDAG-GEFI/Rap1/B-Raf cassette couples M<sub>1</sub> muscarinic acetylcholine receptors to the activation of ERK1/2. *J Biol Chem* **276**: 25568 - 25581 (2001).
- Gustina A.S. y Trudeau M.C.** HERG potassium channel regulation by the N-terminal eag domain. *Cell Signal* **24**: 1592 - 1598 (2012).
- Guy H.R., Durell S.R., Warmke J.W., Drysdale R., Ganetzky B.** Similarities in amino acid sequences of *Drosophila* *eag* and cyclic nucleotide-gated channels. *Science* **254**: 730 (1991).
- Haitin Y., Carlson A.E., Zagotta W.N.** The structural mechanism of KCNH-channel regulation by the eag domain. *Nature* **501**: 444 - 448 (2013).
- Hannon G.J.** RNA interference. *Nature* **418**: 244 - 251 (2002).
- Hayakawa J., Ohmichi M., Tasaka K., Kanda Y., Adachi K., Nishio Y., Hisamoto K., Mabuchi S., Himuna S., Murata Y.** Regulation of the PRL promoter by Akt through cAMP response element binding protein. *Endocrinology* **143**: 13 - 22 (2002).
- Heath B.M., Terrar D.A.** Protein kinase C enhances the rapidly activating delayed rectifier potassium current, I<sub>Kr</sub>, through a reduction in C-type inactivation in guinea-pig ventricular myocytes. *Journal of Physiology* **522**: 391 - 402 (2000).
- Hirsch E., Costa C., Ciralo E.** Phosphoinositide 3-kinases as a common platform for multi-hormone signaling. *J Endocrinol* **194**: 243 - 256 (2007).
- Ho S.N., Hunt H.D., Horton R.M., Pullen J.K., Pease L.R.** Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**: 51 - 59 (1989).
- Hu Y., Yao J., Liu Z., Fu H., Ye Q.** Akt phosphorylates acinus and inhibits its proteolytic cleavage, preventing chromatin condensation. *EMBO J* **24**: 3543 - 4554 (2005).
- Huesken D., Lange J., Mickanin C., Weiler J., Asselbergs F., Warner J., Meloon B., Engel S., Rosenberg A., Cohen D., Labow M., Reinhardt M., Natt F., Hall J.** Design of a genome-wide siRNA library using artificial neural network. *Nat Biotechnol* **23**: 995 - 1001 (2005).
- Huffaker S.J., Chen J., Nicodemus K.K., Sambarato F., Yang F., Mattay V., Lipska B.K., Hyde T.M., Song J., Rujescu D., Giegling I., Mayilyan K., Proust M.J., Soghoyan A., Caforio G., Callicott J.H., Bertolino A., Meyer-Lindenberg A., Chang J., Ji Y., Egan M.F., Goldberg T.E., Kleinman J.E., Lu B., Weinberger D.R.** A primate-specific, brain isoform of KCNH2 affects cortical physiology, cognition, and neuronal repolarization and risk of schizophrenia. *Nat Med* **15**: 509 - 518 (2009).
- Iorns E., Martens-de Kemp S.R., Lord C.J., Ashworth A.** CRK7 modifies the MAPK pathway and influences the response to endocrine therapy. *Carcinogenesis* **30**: 1696 - 1701 (2009).
- Itoh T., Tanaka T., Nagai R., Kamiya T., Sawayama T., Nakayama T., Tomoike H., Sakurada H., Yazaki Y., Nakamura Y.** Genomic organization and mutational



## Bibliografia.

analysis of HERG, a gene responsible for familial long QT syndrome. *Hum Genet* **102**: 435 - 439 (1998).

**Iwabuchi A., Otaka M., Otani S., Jin M., Okuyama A., Itoh S., Sasahara H., Odashima M., Ivan P., Itoh H., Tashima Y., Masamune O., Watanabe S.** Specific preinduction of 60-kDa heat shock protein (chaperonin homolog) by TRH does not protect colonic mucosa against acetic acid-induced lesion in rats. *Dig Dis Sci.* **45**: 1480 - 1489 (2000).

**Iwasaki H., Eguchi S., Ueno H., Marumo F., Hirata Y.** Endothelin-mediated vascular growth requires p42/44 mitogen-activated protein kinase and p70 S6 kinase cascades via transactivation of epidermal growth factor receptor. *Endocrinology* **140**: 4659 - 4668 (1999).

**Jacobs D., Glossip D., Xing H., Muslin A.J., Kornfeld K.** Multiple docking sites on substrate proteins form a modular system that mediates recognition by ERK MAP kinase. *Genes Dev* **13**: 163 - 175 (1999).

**Jiang Z.Y., Zhou Q.L., Coleman K.A., Chouinard M., Boese Q., Czech M.P.** Insulin signaling through Akt/protein kinase B analyzed by small interfering RNA-mediated gene silencing. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 7569 - 7574 (2003).

**Judd A.M., Koike K., MacLeod R.M.** A possible role of arachidonate metabolism in the mechanism of prolactin release. *Am J Physiol* **250**: 288 - 295 (1986).

**Judge A.D., Sood V., Shaw J.R., McClintock K., MacLachlan I.** Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nature Biotech* **23**: 457 - 462 (2005).

**Kagan A., Melman Y.F., Krumerman A., McDonald T.V.** 14-3-3 amplifies and prolongs adrenergic stimulation of HERG K<sup>+</sup> channel activity. *The EMBO Journal* **21**: 1889 - 1898 (2002).

**Kanasaki H., Fukunaga K., Takahashi K., Miyazaki K., Miyamoto E.** Mitogen-activated protein kinase activation by stimulation with thyrotropin-releasing hormone in rat pituitary GH<sub>3</sub> cells. *Biol Reprod* **61**: 319 - 325 (1999).

**Kaplan W.D., Trout W.E.3rd.** The behavior of four neurological mutants of *Drosophila*. *Genetics* **61**: 399-409 (1969).

**Katome T., Obata T., Matsushima R., Masuyama N., Cantley L.C., Gotoh Y., Kishi K., Shiota H., Ebina Y.** Use of RNA Interference-mediated Gene Silencing and Adenoviral Overexpression to Elucidate the Roles of AKT/Protein

Kinase B Isoforms in Insulin Actions. *J Biol Chem* **278**: 28312 - 28323 (2003).

**Kenakin T.** Differences between natural and recombinant G protein-coupled receptor systems with varying receptor/G protein stoichiometry. *Trends Pharmacol Sci* **18**: 456 - 464 (1997).

**Kiehn J., Karle C., Thomas D., Yao X., Brachmann J., Kübler W.** HERG potassium channel activation is shifted by phorbol esters via protein kinase A-dependent pathways. *J Biol Chem* **273**: 25285 - 25291 (1998).

**Kiehn J.** Regulation of the cardiac repolarizing HERG potassium channel by Protein kinase A. *Trends Cardiovasc Med* **10**: 205 - 209 (2000).

**Kikani C.K., Antonysamy S.A., Bonanno J.B., Romero R., Zhang F.F., Russell M., Gheyi T., Iizuka M., Emtage S., Sauder J.M., Turk B.E., Burley S.K., Rutter J.** Structural bases of PAS domain-regulated kinase (PASK) activation in the absence of activation loop phosphorylation. *J Biol Chem* **285**: 41034 - 41043. (2010).

**Kiley S.C., Parker P.J., Fabbro D., Jaken S.** Differential regulation of protein kinase C isozymes by thyrotropin-releasing hormone in GH4C1 cells. *J Biol Chem* **266**: 23761 - 23768 (1991).

**Kinoshita E., Takahashi M., Takeda H., Shiro M., Koike T.** Recognition of phosphate monoester dianion by an alkoxide-bridged dinuclear zinc(II) complex. *Dalton Trans* 1189 - 1193 (2004).

**Kolch W.** Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 827 - 837 (2005).

**Kosako H.** Phos-tag Western blotting for detecting stoichiometric protein phosphorylation in cells. *Protocol Exchange* doi: [10.1038/nprot.2009.170](https://doi.org/10.1038/nprot.2009.170) (2009).

**Kranenburg O., Verlaan I., Moolenaar W.H.** G<sub>i</sub>-mediated tyrosine phosphorylation of Grb2 (growth-factor-receptor-bound protein 2)-bound dynamin-II by lysophosphatidic acid. *Biochem J* **339**: 11 - 14 (1999).

**Kruse M., Hammond G.R., Hille B.** Regulation of voltage-gated potassium channels by PI(4,5)P<sub>2</sub>. *J Gen Physiol* **140**: 189 - 205 (2012).

**Kubowicz P., Żelaszczyk D., Pękala E.** RNAi in clinical studies. *Curr Med Chem* **20**: 1801 - 1816 (2013).

**Kumar C.C., Madison V.** AKT crystal structure and AKT-specific inhibitors. *Oncogene* **24**: 7493 - 7501 (2005).

- Lamberts S.W, Macleod R.M.** Regulation of prolactin secretion at the level of the lactotroph. *Physiol Rev* **70**: 279 - 318 (1990).
- Laroche-Joubert N., Marsy S., Michelet S., Imbert-Teboul M., Doucet A.** Protein kinase A-independent activation of ERK and H,K-ATPase by cAMP in native kidney cells: role of Epac I. *J Biol Chem* **277**: 18598 - 18604 (2002).
- Lastraioli E., Guasti L., Crociani O., Polvani S., Hofmann G., Witchel H., Bencini L., Calistri M., Messerini L., Scatizzi M., Moretti R., Wanke E., Olivotto M., Mugnai G., Arcangeli A.** herg1 gene and HERG1 protein are overexpressed in colorectal cancers and regulate cell invasion of tumor cells. *Cancer Res* **64**: 606 - 611 (2004).
- Lavan B.E., Fantin V.R., Chang E.T., Lane W.S., Keller S.R., Lienhard G.E.** 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 (1997).
- Lee C.S., Duesbery N.S.** Highly selective MEK inhibitors. *Current Enzyme Inhibition* **6**: 146 - 157 (2010).
- Lees-Miller JP., Kondo C., Wang L., Duff HJ.** Electrophysiological characterization of an alternatively processed ERG K<sup>+</sup> channel in mouse and human hearts. *Circ Res* **81**: 719 - 726 (1997).
- Lemmon M.A., Schlessinger J.** Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **141**: 1117 - 1134 (2010).
- Li Y., Sroubek J., Krishnan Y., McDonald T.V.** A-Kinase Anchoring Protein Targeting of Protein Kinase A and Regulation of HERG Channels. *J Membrane Biol* **223**: 107 - 116 (2008).
- Li Q., Gayen S., Chen A.S., Huang Q., Raida M., Kang C.** 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 (2010).
- Liang J., Ge F., Guo C., Luo G., Wang X., Han G., Zhang D., Wang J., Li K., Pan Y., Yao L., Yin Z., Guo X., Wu K., Ding J., Fan D.** Inhibition of PI3K/Akt partially leads to the inhibition of PrP(C)-induced drug resistance in gastric cancer cells. *FEBS J* **276**: 685 - 694 (2009).
- London B., Trudeau M.C., Newton K.P., Beyer A.K., Copeland N.G., Gilbert D.J., Jenkins N.A., Satler C.A., Robertson G.A.** Two isoforms of the mouse ether-a-go-go-related gene coassemble to form channels with properties similar to the rapidly activating component of the cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> current. *Circ Res* **81**: 870 - 878 (1997).
- Lu Y., Mahaut-Smith M.P., Varghese A., Huang C.L., Kemp P.R., Vanderberg J.L.** Effects of premature stimulation on HERG K<sup>+</sup> channels. *J Physiol* **537**: 843 - 851 (2001).
- Luo L., Stopa E.G.** Thyrotropin releasing hormone inhibits tau phosphorylation by dual signaling pathways in hippocampal neurons. *J Alzheimers Dis.* **6**: 527 - 536 (2004).
- Mann M., Ong S.E., Grønborg M., Steen H., Jensen O.N., Pandey A.** Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome. *Trends Biotechnol* **20**: 261 - 268 (2002).
- Manning B.D., Cantley L.C.** AKT/PKB Signaling: Navigating downstream. *Cell* **129**: 1261 - 1274 (2007).
- Martin T.F., Hsieh K.P., Porter B.W.** The sustained second phase of hormone-stimulated diacylglycerol accumulation does not activate protein kinase C in GH3 cells. *J Biol Chem* **265**: 7623 - 7631 (1990).
- Matthews J.C.** Fundamentals of receptor, enzyme and transport kinetics. CRC, FL, USA. (1993).
- Meister G., Thomas T.** Mechanism of gene silencing by double stranded RNA. *Nature* **431**: 343 - 349 (2004).
- Menéndez S.T., Rodrigo J.P., Alvarez-Teijeiro S., Villaronga M.Á., Allonca E., Vallina A., Astudillo A., Barros F., Suárez C., García-Pedrero J.M.** Role of HERG1 potassium channel in both malignant transformation and disease progression in head and neck carcinomas. *Mod Pathol* **25**: 1069-78 (2012).
- Millares P., LaCourse E.J., Perally S., Ward D.A., Prescott M.C., Hodgkinson J.E., Brophy P.M., Rees H.H.** Proteomic Profiling and Protein Identification by MALDITOF Mass Spectrometry in Unsequenced Parasitic. *Plos One* **7**: e33590 (2012).
- Miranda P., Giráldez T., de la Peña P., Manso D.G., Alonso-Ron C., Gómez-Varela D., Domínguez P., Barros F.** Specificity of TRH-R coupling to G-proteins for regulation of ERG K<sup>+</sup> channels in GH<sub>3</sub> rat anterior pituitary cells. *J Physiol* **566**: 717 - 736 (2005).
- Miranda P.** Componentes moleculares de la regulación hormonal de los canales *erg* por TRH y arquitectura molecular de los dominios citoplasmáticos de *h-erg*. Tesis

## Bibliografía.

doctoral. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Oviedo (2008).

**Mittal V.** Improving the efficiency of RNA interference in mammals. *Nat Rev Genet* **5**: 355 - 365 (2004).

**Mochizuki N., Ohba Y., Kiyokawa E., Kurata T., Murakami T., Ozaki T., Kitabatake A., Nagashima K., Matsuda M.** Activation of the ERK/MAPK pathway by an isoform of rap1GAP associated with  $G_{\alpha_i}$ . *Nature* **400**: 891 - 894 (1999).

**Moffat J. y Sabatini D.M.** Building mammalian signalling pathways with RNAi screens. *Nat Rev* **7**: 177 - 187 (2006).

**Montaner S.** Akt/TSC/mTOR activation by the KSVH G protein-coupled receptor. *Cell Cycle* **6**: 438 - 443 (2007).

**Montoya A., Beltrán L., Casado P., Rodríguez-Prados J-C., Cutillas P. R.** Characterization of a TiO<sub>2</sub> enrichment method for label-free quantitative phosphoproteomics. *Methods* **54**: 370 - 378 (2011).

**Morais-Cabral J.H., Lee A., Cohen S.L., Chait B.T., Li M., Mackinnon R.** Crystal Structure and Functional Analysis of the HERG Potassium Channel N Terminus: A Eukaryotic PAS Domain. *Cell* **95**: 649 - 655 (1998).

**Muskett F.W., Thouta S., Thomson S.J., Bowen A., Stansfeld P.J., Mitcheson J.S.** Mechanistic Insight into Human *ether-à-go-go*-related Gene (hERG) K<sup>+</sup> Channel Deactivation Gating from the Solution Structure of the EAG Domain. *J Biol Chem* **286**: 6184 - 6191 (2011).

**Nanduri J., Bergson P., Wang N., Ficker E., Prabhakar N.R.** Hypoxia inhibits maturation and trafficking of hERG K<sup>+</sup> channel protein: role of Hsp90 and ROS. *Biochem Biophys Res Commun* **388**: 212 - 216 (2009).

**Ng C.A., Hunter M.J., Perry M.D., Mobli M., Ke Y., Kuchel P.W., King G.F., Stock D., Vandenberg J.I.** The N-terminal tail of hERG contains an amphipathic  $\alpha$ -helix that regulates channel deactivation. *PLoS One* **6**: e16191 (2011).

**Noske A., Kaszubiak A., Weichert W., Sers C., Niesporek S., Koch I., Schaefer B., Sehouli J., Dietel M., Lage H. Denkert C.** Specific inhibition of AKT2 by RNA interference results in reduction of ovarian cancer cell proliferation: Increased expression of AKT in advanced ovarian cancer. *Cancer Lett* **20**: 1 - 11 (2006).

**Ohmichi M., Sawada T., Kanda Y., Koike K., Hirota K., Miyake A., Saltiel A.R.** Thyrotropin-releasing hormone stimulates MAP kinase activity in GH<sub>3</sub> cells by divergent

pathways. Evidence of a role for early tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* **269**: 3783 - 3788 (1994).

**Ohtsu H., Dempsey P.J., Eguchi S.** ADAMs as mediators of EGF receptor transactivation by G protein-coupled receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* **291**: C1-C10 (2006).

**Ozawa S., Sand O.** Electrophysiology of excitable endocrine cells. *Physiol Rev* **66**: 887 - 952 (1986).

**Palomero T.** Mecanismos de activación de la MAPK por el receptor de TRH. *Tesis doctoral*. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Oviedo (1998).

**Palomero T., Barros F., del Camino D., Vilorio C.G., de la Peña P.** 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 (1998).

**Papa M., Boscia F., Canitano A., Castaldo P., Sellitti S., Annunziato L., Tagliatela M.** Expression pattern of the ether-à-gogo-related (ERG) K<sup>+</sup> channel-encoding genes ERG1, ERG2 y ERG3 in the adult rat central nervous system. *J. Comp. Neurol* **466**: 119 - 135 (2003).

**Pardo L.A., del Camino D., Sanchez A., Alves F., Bruggemann A., Beckh S., Stuhmer W.** Oncogenic potential of EAG K<sup>+</sup> channels. *EMBO J.* **18**: 5540 - 5547 (1999).

**Pearson G., Robinson F., Gibson T.B., Xu B. E., Karandikar M., Berman K., Cobb M.H.** Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrinol Rev* **22**: 153 - 183 (2001).

**Perry M., Sanguinetti M., Mitcheson J.** Revealing the structural basis of action of hERG potassium channel activators and blockers. *J Physiol* **588**: 3157 - 3167 (2010).

**Pessia M., Servettini I., Panichi R., Guasti L., Grassi S., Arcangeli A., Wanke E., Pettorossi V.E.** ERG voltage-gated K<sup>+</sup> channels regulate excitability and discharge dynamics of the medial vestibular nucleus neurons. *J Physiol* **586**: 4877 - 4890 (2008).

**Pongs O., Schwarz J.R.** Ancillary subunits associated with voltage-dependent K<sup>+</sup> channels. *Physiol Rev* **90**: 755 - 796 (2010).

**Radhika V., Dhanasekaran N.** Transforming G proteins. *Oncogene* **20**: 1607 - 1614 (2001).

- Raman M., Chen W., Cobb M.H.** Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* **26**: 3100 - 3112 (2007).
- Ramsdell J.S., Tashjian A.H.jr.** 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 (1986).
- Ravindra R., Forman L.J., Foster K.A., Patel S.A.** Effect of thyrotropin-releasing hormone on microtubules in GH3 cells. *Neuroreport*. **6**: 1405 - 1408 (1995).
- Ray L.B. y Sturgill T.W.** Rapid stimulation by insulin of a serine/threonine kinase in 3T3-L1 adipocytes that phosphorylates microtubule-associated protein 2 in vitro. *Proc Natl Acad Sci* **84**: 1502 - 1506 (1987).
- Reichlin S.** The hypothalamus in human disease: achievements and challenges. *Acta Neurochir (Wien)*. **75**: 3 - 4 (1985).
- Reynolds A., Leake D., Scaringe S., Marshall W.S., Khvorova A.** Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol* **22**: 326 - 330 (2004).
- Robbins D.J., Zhen E., Owaki H., Vanderbilt C.A., Ebert D., Geppert T.D., Cobb M.H.** Regulation and properties of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 in vitro. *J Biol Chem* **268**: 5097 - 5106 (1993).
- Roosild T.P., Le K.T., Choe S.** Cytoplasmic gatekeepers of K<sup>+</sup> channel flux: a structural perspective. *Trends Biochem Sci* **29**: 39 - 45 (2004).
- Roskoski Jr R.** RAF protein-serine/threonine kinases: structure and regulation. *Biochem and Biophys. Res Comm* **399**: 313 - 317 (2010).
- Roskoski Jr R.** MEK1/2 dual-specificity protein kinases: structure and regulation. *Biochem and Biophys. Res Comm* **417**: 5 - 10 (2012).
- Rutter J., Michnoff C.H., Harper S.M., Gardner K.H., McKnight S.L.** PAS Kinase: an evolutionarily conserved PAS domain-regulated serine/threonine kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 8991 - 8996 (2001).
- Sacco T., Bruno A., Wanke E., Tempia F.** Functional roles of an ERG current isolated in cerebellar Purkinje neurons. *J Neurophysiol* **90**: 1817 - 1828 (2003).
- Sale E.M., Sale G.J.** Protein kinase B: signalling roles and therapeutic targeting. *Cell Mol Life Sci* **65**: 113 - 127 (2008).
- Sambrook J. y Russell D.W.** Molecular cloning a laboratory manual. *Ed Cold Spring Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY* (1989).
- Sanguinetti M.C., Jiang C., Curran M.E., Keating M.T.** A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: *HERG* encodes the IKr potassium channel. *Cell* **81**: 299 - 307 (1995).
- Sarbassov D.D., Guertin D.A., Ali S.M., Sabatini D.M.** Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **307**: 1098 - 1101 (2005).
- Schäfer R., Wulfsen I., Behrens S., Weinsberg F., Bauer C.K., Schwarz J.R.** The erg-like current in rat lactotrophs. *J Physiol* **518**: 401 - 416 (1999).
- Schläfli P., Bortler E., Spielmann P., Wenger R. H.** The PAS-domain kinase PASKIN: a new sensor in energy homeostasis. *Cell Mol Life Sci* **66**: 876 - 883 (2009).
- Schläfli P., Tröger J., Eckhardt K., Bortler E., Spielmann P., Wenger R.H.** Substrate preference and phosphatidylinositol monophosphate inhibition of the catalytic domain of the Per-Arnt-Sim domain kinase PASKIN. *FEBS Journal* **278**: 1757 - 1768 (2011).
- Schledermann W., Wulfsen I., Schwarz J.R., Bauer C.K.** Modulation of rat erg1, erg2, erg3 and HERG K<sup>+</sup> currents by thyrotropin-releasing hormone in anterior pituitary cells via the native signal cascade. *J Physiol* **532**: 143 - 163 (2001).
- Schonwasser D.C., Marais R.M., Marshall C.J., Parker P.J.** Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isotopes. *Mol Cell Biol* **18**: 790 - 798 (1998).
- Schram G., Pourrier M., Melnyk P., Nattel S.** Differential distribution of cardiac ion channel expression as a basis for regional specialization in electrical function. *Circ Res* **90**: 939 - 950 (2002).
- Selkirk J.V., Prince G.W., Nahorski S.R., Challiss R.A.** Cell type specific differences in the coupling of recombinant mGlu 1 alpha receptors to endogenous G proteins sub-populations. *Neuropharmacology*. **40**: 645 - 656 (2001).

## Bibliografia.

- Sharrocks A.D., Yang S.H., Galanis A.** Docking domains and substrate-specificity determination for MAP kinases. *Trends Biochem Sci* **25**: 448 - 453 (2000).
- Shi W., Wymore R.S., Wang H.S., Pan Z., Cohen I.S., McKinnon D., Dixon J.E.** Identification of two nervous system-specific members of the *erg* potassium channel gene family. *J Neurosci* **17**: 9423 - 9432 (1997).
- Sioud M.** Induction of inflammatory cytokines and interferon responses by double-stranded and single-stranded siRNA is sequence-dependent and requires endosomal localization. *J Mol Biol* **348**: 1079 - 1090 (2005).
- Smith P.L., Baukowitz T., Yellen G.** The inward rectification mechanism of the *HERG* cardiac potassium channel. *Nature* **379**: 833 - 836 (1996).
- Smith J., Yu R., Hinkle P.M.** Activation of MAPK by TRH Requires Clathrin Dependent Endocytosis and PKC but Not Receptor Interaction with  $\beta$ -Arrestin or Receptor Endocytosis. *Mol. Endocrinol* **15**: 1539 - 1548 (2001).
- Sondej M., Denny P.A., Xie Y., Ramachandran P., Si Y., Takashima J., Shi W., Wong D.T., Loo J.A., Denny P.C.** Glycoprofiling of the Human Salivary Proteome. *Clin Proteomics* **5**: 52 - 68 (2009).
- Song G., Ouyang G., Bao S.** The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med* **9**: 59 - 71 (2005).
- Spector P.S., Curran M.E., Keating M.T., Sanguinetti M.C.** Class III antiarrhythmic drugs block *HERG*, a human cardiac delayed rectifier  $K^+$  channel. Open-channel block by methanesulfonanilides. *Circ Res* **78**: 499 - 503 (1996).
- Stelman L.S., Chappell W.H., Abrams S.L., Kempf R.C., Long J., Laidler P., Mijatovic S., Maksimovic-Ivanic D., Stivala F, Mazzarino M.C., Donia M, Fagone P., Malaponte G., Nicoletti F., Libra M., Milella M., Tafuri A., Bonati A., Bäsecke J., Cocco L., Evangelisti C., Martelli A.M., Montalto G., Cervello M., McCubrey J.A.** Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging* **3**: 192 - 222 (2011).
- Steinmetz M.O., Jahnke W., Towbin H., García-Echeverría C., Voshol H., Müller D., van Oostrum J.** Phosphorylation disrupts the central helix in Op18/stathmin and suppresses binding to tubulin. *EMBO Rep* **2**: 505 - 510 (2001).
- Storey N.M., O'Brian J.P., Armstrong D.L.** Rac and Rho mediate opposing hormonal regulation of the ether-a-go-go-related potassium channel. *Curr Biol* **12**: 27 - 33 (2002).
- Tagliatela M., Castaldo P., Iossa S., Pannaccione A., Fresi A., Ficker E., Annunziato L.** Regulation of the human ether-a-gogo related gene (*HERG*)  $K^+$  channels by reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci* **94**: 11698 - 11703 (1997).
- Tagliatela M., Pannaccione A., Iossa S., Castaldo P., Annunziato L.** Modulation of the  $K^+$  Channels Encoded by the Human Ether-a-Gogo-Related Gene-1 (*hERG1*) by Nitric Oxide. *Mol Pharm* **56**: 1298 - 1308 (1999).
- Tamargo J., Caballero R., Gómez R., Valenzuela C., Delpón E.** Pharmacology of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res* **62**: 9 - 33 (2004).
- Thomas D., Zhang W., Karle C.A., Kathöfer S., Schöls W., Kübler W., Kiehn J.** Deletion of protein kinase A phosphorylation sites in the *HERG* potassium channel inhibits activation shift by protein kinase A. *J Biol Chem* **274**: 27457 - 27462 (1999).
- Thomas C.C., Deak M., Alessi D.R., van Aalten D.M.** High-resolution structure of the pleckstrin homology domain of protein kinase b/akt bound to phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate. *Curr Biol* **12**: 1256 - 1262 (2002).
- 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., Karle C.A.** Regulation of *HERG* potassium channel activation by protein kinase C independent of direct phosphorylation of the channel protein. *Cardiovasc Res* **59**: 14 - 26 (2003).
- Thomas D., Hammerling B.C., Wimmer A-B., Wu K., Ficker E., Kuryshev Y.A., Scherer D., Kiehn J., Katus H.A., Schoels W., Karle C.A.** Direct block of *hERG* potassium channels by the protein kinase C inhibitor bisindolylmaleimide I (GF109203X). *Cardiovascular Research* **64**: 467 - 476 (2004).
- Thomas D., Karle C.A., Kiehn J.** The cardiac *hERG/IKr* potassium channel as pharmacological target: structure, function, regulation, and clinical applications. *Curr Pharm Des* **12**: 2271 - 2283 (2006).
- Tomida J., Kitao H., Kinoshita E., Takata M.** Detection of phosphorylation on large proteins by western blotting using Phos-tag containing gel. *Protocol Exchange* doi: 10.1038/nprot.2008.232 (2008).

- Trudeau M.C., Warmke J.W., Ganetzky B., Robertson G.A.** HERG a human inward rectifier in the voltage gated potassium channel family. *Science* **269**: 92 - 95 (1995).
- Tsumori M., Murakami Y., Koshimura K., Kato Y.** Thyrotropin-releasing hormone stimulates nitric oxide release from GH3 cells. *J Neuroendocrinol* **11**: 451 - 456 (1999).
- Tsyba L., Nikolaienko O., Dergai O., Dergai M., Novokhatska O., Skrypkina I., Rynditch A.** Intersectin multidomain adaptor proteins: regulation of functional diversity. *Gene* **473**: 67 - 75 (2011).
- Vacher H., Trimmer J.S.** Diverse roles for auxiliary subunits in phosphorylation-dependent regulation of mammalian brain voltage-gated potassium channels. *Pflugers Arch* **462**: 631 - 643 (2011).
- Valencia-Sánchez M.A., Liu J., Hannon G. J., Parker R.** Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes & Dev* **20**: 515 - 524 (2006).
- Vandenberg J.I., Perry M.D., Perrin M.J., Mann S.A., Ke Y., Hill A.P.** hERG K(+) channels: structure, function, and clinical significance. *Physiol Rev* **92**: 1393 - 1478 (2012).
- Vantaggiato C., Formentini I., Bondanza A., Bonini C., Naldini L., Brambilla R.** ERK1 and ERK2 mitogen-activated protein kinases affect Ras-dependent cell signaling differentially. *J Biol* **5**: 14 (2006).
- Villalobos C. y García-Sancho J.** Capacitative calcium entry contribuyes to the Ca<sup>2+</sup> influx induced by thyrotropin-releasing hormona in GH<sub>3</sub> pituitary cells. *Pflügers Arch* **430**: 923 - 935 (1995).
- Viloria C. G.** Relaciones estructura-función en el receptor de TRH y el canal de K<sup>+</sup> cardiaco h-erg. Tesis Doctoral, Facultad de Medicina, Universidad de Oviedo (2000).
- Viloria C.G., Barros F., Giráldez T., Gómez-Varela D., de la Peña P.** Differential effects of amino-terminal distal and proximal domains in the regulation of human erg K(+) channel gating. *Biophys J* **79**: 231 - 246. (2000).
- Wagner II L.E., Li W-H., Joseph S.K., Yule D.I.** Functional Consequences of Phosphomimetic Mutations at Key cAMP-dependent Protein Kinase Phosphorylation Sites in the Type 1 Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor. *J Biol Chem* **44**: 46242 - 46262 (2004).
- Walker V.E., Atanasiu R., Lam H., Shrier A.** Co-chaperone FKBP38 promotes HERG trafficking. *J Biol Chem* **282**: 23509 - 23516 (2007).
- Walker V.E., Wong M.J., Atanasiu R., Hantouche C., Young J.C., Shrier A.** Hsp40 chaperones promote degradation of the HERG potassium channel. *J Biol Chem* **285**: 3319 - 3329 (2010).
- Wang S., Liu S., Morales M.J., Strauss H.C., Rasmusson R.L.** A quantitative analysis of the activation and inactivation kinetics of HERG expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* **502**: 45 - 60 (1997)a.
- Wang X.J., Reynolds E.R., Deak P., Hall L.M.** The seizure locus encodes the *Drosophila* homolog of the HERG potassium channel. *J Neurosci* **17**: 882 - 890 (1997)b.
- Wang Y.H., Maurer R.A.** A role for the mitogen-activated protein kinase in mediating the ability of thyrotropin-releasing hormone to stimulate the prolactin promoter. *Mol Endocrinol* **13**: 1094 - 1104 (1999).
- Wang Y., Huang X., Zhou J., Yang X., Li D., Mao H., Sun H.H., Liu N., Lian J.** Trafficking-deficient G572R-hERG and E637K-hERG activate stress and clearance pathways in endoplasmic reticulum. *PLoS One* **7**: e29885. doi: 10.1371/journal.pone.0029885 (2012).
- Warmke J.W., Ganetzky B.** A family of potassium channel genes related to *eag* in *Drosophila* and mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 3438 - 3442 (1994).
- Washburn M.P., Ulaszek R.R., Yates J.R. 3<sup>rd</sup>.** Reproducibility of quantitative proteomic analyses of complex biological mixtures by multidimensional protein identification technology. *Anal Chem* **75**: 5054 - 5061 (2003).
- Watabe-Uchida M., John K.A., Janas J.A., Newey S.E., Van Aelst L.** The Rac activator DOCK7 regulates neuronal polarity through local phosphorylation of stathmin/Op18. *Neuron* **51**: 727 - 739 (2006).
- Waters C.M., Connell M.C., Pyne S., Pyne N.J.** c-Src is involved in regulating signal transmission from PDGFbeta receptor-GPCR(s) complexes in mammalian cells. *Cell Signal* **17**: 263 - 277 (2005).
- Weissman J.T., Ma J.N., Essex A., Gao Y., Burstein E.S.** G-protein-coupled receptor-mediated activation of rap GTPases: characterization of a novel G $\alpha_1$  regulated pathway. *Oncogene* **23**: 241 - 249 (2002).

## Bibliografia.

- Widmann C., Gibson S., Jarpe M.B., Johnson G.L.** Mitogen activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* **79**: 143 - 180 (1999).
- Wilson W.A., Skurat A.V., Probst B., de Paoli-Roach A., Roach P.J., Rutter J.** Control of mammalian glycogen syntase by PAS kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 16596 - 16601 (2005).
- Wymore R.S., Gintant G.A., Wymore R.T., Dixon J.E., McKinnon D., Cohen I.S.** Tissue and species distribution of mRNA for the  $I_{kr}$ -like  $K^+$  channel, *erg*. *Circ Res* **80**: 261 - 268 (1997).
- Yang J., Cron P., Good V.M., Thompson V., Hemmings B.A., Barford D.** Crystal structure of an activated Akt/protein kinase B ternary complex with GSK3-peptide and AMP-PNP. *Nat Struct Biol.* **9**: 940 - 944 (2002).
- Ye X., Paroo Z., Liu Q.** Functional anatomy of the Drosophila MicroRNA-generating enzyme. *J. Biol. Chem.* **282**: 28373 - 28378 (2007).
- Zehelein J., Zhang W., Koenen M., Graf M., Heinemann S.H., Katus H.A.** Molecular cloning and expression of *cERG*, the ether a go-go-related gene from canine myocardium. *Pflugers Arch* **442**: 188 - 191 (2001).
- Zhang Y., Wang H., Wang J., Han H., Nattel S., Wang Z.** Normal function of HERG  $K^+$  channels expressed in HEK293 cells requires basal protein kinase B activity. *FEBS Letters* **534**: 125 - 132 (2003).
- Zhang D.Y., Wang Y., Lau C.P., Tse H.F., Li G.R.** Both EGFR kinase and Src-related tyrosine kinases regulate human ether-à-go-go-related gene potassium channels. *Cell Signal* **20**: 1815 -1821 (2008).
- Zhang Y., Opreško L., Shankaran H., Chrisler W.B., Wiley H.S., Resat H.** HER/ErB receptor interactions and signalling patterns in human mammary epithelial cells. *BMC Cell Biol* **10**: 78 - 92 (2009).
- Zhong M., Yang M., Sanborn B.M.** Extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation by myometrial oxytocin receptor involves  $G_{\alpha_q}G\beta\gamma$  and epidermal growth factor receptor tyrosine kinase activation. *Endocrinology* **144**: 2947 - 2956 (2003).
- Zhou W., Cayabyab F.S., Pennefather P.S., Schlichter L.C., DeCoursey T.E.** HERG-like potassium channels in microglia. *J Gen Physiol* **111**: 781 - 794 (1998).
- Zhou T., Sun L., Humphreys J., Goldsmith E.J.** Docking interactions induce exposure of activation loop in the MAP kinase ERK2. *Structure* **14**: 1011 - 1019 (2006).
- Zhu Y., Golden C.M., Ye J., Wang X.Y., Akbarali H.I., Huizinga J.D.** ERG  $K^+$  currents regulate pacemaker activity in ICC. *Am J Physiol Gastrointest liver Physiol* **285**: G1249 - 1258 (2003).

## **Publicaciones.**







## FRET with multiply labeled HERG K<sup>+</sup> channels as a reporter of the in vivo coarse architecture of the cytoplasmic domains

Pablo Miranda<sup>a,1</sup>, Diego G. Manso<sup>a,1</sup>, Francisco Barros<sup>a,\*</sup>, Luis Carretero<sup>a</sup>, Thomas E. Hughes<sup>b</sup>, Carlos Alonso-Ron<sup>a</sup>, Pedro Domínguez<sup>a</sup>, Pilar de la Peña<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Edificio Santiago Gascón, Campus del Cristo, Universidad de Oviedo. E-33006. Oviedo, Asturias, Spain

<sup>b</sup> Department of Cell Biology and Neuroscience, Montana State University, Bozeman, Montana 59717, USA

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 29 November 2007  
Received in revised form 30 May 2008  
Accepted 2 June 2008  
Available online 19 June 2008

#### Keywords:

HERG  
Potassium channel  
Cytoplasmic domain architecture  
FRET

### ABSTRACT

The intracellular N-terminus of human *ether-a-go-go*-related gene (HERG) potassium channels constitutes a key determinant of activation and deactivation characteristics and is necessary for hormone-induced modifications of gating properties. However, the general organization of the long amino and carboxy HERG terminals remains unknown. In this study we performed fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy with a library of fluorescent HERG fusion proteins obtained combining site-directed and transposon-based random insertion of GFP variants into multiple sites of HERG. Determinations of FRET efficiencies with functional HERG channels labeled in different combinations localize the fluorophores, introduced in the amino and carboxy ends, in two quadratic planes of 7.8 and 8.6 nm lateral size, showing a vertical separation of nearly 8 nm without major angular torsion between the planes. Similar analysis using labels at positions 345 and 905 of the amino and carboxy terminals, located them slightly above the planes delimited by the amino and carboxy end labels, respectively. Our data also indicate an almost vertical arrangement of the fluorophores introduced in the NH<sub>2</sub> and COOH ends and at position 905, but a near 45° angular rotation between the planes delimited by these labels and the 345-located fluorophores. Systematic triangulation using interfluorophore distances coming from multiply labeled channels provides an initial constraint on the overall in vivo arrangement of the HERG cytoplasmic domains, suggesting that the C-linker/CNBD region of HERG hangs centrally below the transmembrane core, with the initial portion of the amino terminus around its top and side surfaces directed towards the gating machinery.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

The human *ether-a-go-go* related gene encodes a channel (HERG) that is a member of the *EAG* family of voltage-dependent potassium channels, molecularly characterized by a pore-loop transmembrane region [1] assembled in a tetramer of four identical (or similar) subunits surrounding a central pore [2]. To this basic pattern of the central transmembrane structure, two general arrangements of cytoplasmic modules have been added through evolution. In the prototypical Kv voltage-dependent K<sup>+</sup> channels, an amino terminal T1 domain corresponding to a symmetrical tetrameric structure is located below the transmembrane core, determining the subunit assembly and the attachment of accessory β-subunits and other modulators. Little is known about the molecular organization of the remaining cytoplasmic domains [2–6]. In a second group of channels, including those gated by intracellular ligands, hyperpolarization-activated channels, sensory stimuli-sensitive TRP channels and depolarization-gated KCNQ and

*EAG/erg* K<sup>+</sup> channels, the T1 domain is lacking and sometimes is substituted by a C-terminal four-fold symmetrical structure hanging below the core [2,7–9]. In these cases, the relative arrangement of the amino terminals and/or the rest of the cytoplasmic domains between them and with respect to the channel core remains unknown.

In HERG channels, the general organization of the cytoplasmic domains remains obscure. Sequence conservation between HERG and HCN channels would be consistent with a localization of the carboxy terminal C-linker/CNBD as a compact tetrameric structure in a central position immediately below the cytoplasmic pore opening as has been previously proposed for HCN and TRP channels [8–10]. Indeed, a participation of this region in the tetrameric assembly of HERG has also been proposed [11]. However, only defective trafficking to the plasma membrane but not an impaired ability to assemble into tetramers has been demonstrated for channels lacking the CNBD or different sections of the carboxy terminus of HERG [11–15]. A compact oligomeric amino terminal *EAG/PAS* domain would also be compatible with the ability of this region to form tetramers in vitro in the absence of the rest of the protein, and to inhibit the functional expression of wild-type HERG [16]. It has also been shown that N-terminal interactions are involved in the heteromeric assembly of HERG 1a and 1b subunits [17]. How-

\* Corresponding author. Fax: +34 98 510 3157.

E-mail address: [fbarros@uniovi.es](mailto:fbarros@uniovi.es) (F. Barros).

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

ever, this protein segment only forms monomers in crystal structures [18], and channels truncated at residue 725 of the carboxy terminus are not able to assemble in spite of the presence of an intact EAG/PAS domain [11]. It has also been shown that HERG N-terminal truncations that delete the EAG/PAS domain still allow the formation of functional channels in the plasma membrane [18–22].

Voltage sensors and gating elements have been mapped to the transmembrane region of voltage-gated potassium channels. However, the amino- and carboxy-terminal cytoplasmic domains also play a key role in activation and deactivation gating of these channels (for reviews see [7,23,24]). This can be particularly significant for HERG, since it operates as an inward rectifier although it has the typical molecular arrangement of depolarization-activated channels [25]. Such a kinetic behaviour is critical for normal cardiac repolarization and setting electrical parameters in a variety of cells [reviewed in 26–28]. As in other voltage-dependent  $K^+$  channels, voltage sensors and gating elements in HERG are located within the core transmembrane region [29–34]. However, it is also known that the initial part of the HERG N-terminus determines its slow deactivation [18,20–22,35,36], and that the presence of a structurally intact proximal domain, also in the amino terminus, is essential for maintenance of normal activation properties and hormonal modulation of activation and deactivation parameters [21,37–39]. Therefore, unravelling the general structure of those HERG cytoplasmic regions associated with its gating is important for understanding how this channel controls fundamental physiological events such as cardiac rhythm and contraction, hormone secretion, and tumour cell proliferation [26–28].

Given the importance of knowing the relative position and the structural organization of HERG intracellular structures, in this report we have tried to get some insight into the basic architecture of the amino and carboxy HERG terminals *in vivo*. For this purpose we generated a library of HERG fluorescent fusion proteins useful for fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy studies, combining the directed insertion of the labels in specific positions with a random insertion of the cyan (CFP) and yellow (YFP) variants of the green fluorescent protein (GFP) into multiple sites by a transposon-based technique [40,41]. Next we performed an electrophysiological screening of the library looking for correctly assembling constructs that might provide insights about the positioning and functional implications of some specific regions in the context of the whole channel. Also, donor de-quenching following photobleaching of the acceptor fluorophore was used for a quantitative determination of FRET efficiencies [42–46] of several library constructs. Subsequent estimation of interfluorophore distances and the performance of “multiple molecular triangulation” with fluorophores located at various positions provided a useful initial constraint on the coarse structure of the channel tetramer, clarifying the relative arrangement of some key landmarks on the cytoplasmic ends of HERG.

## 2. Materials and methods

### 2.1. CFP/YFP tagging of HERG channels

The original plasmid construct containing the cDNA of the HERG channel was a gift of Dr. E. Wanke (University of Milan, Italy). To generate HERG channels N-terminally labeled with the enhanced yellow (EYFP) or cyan (ECFP) fluorescent protein (subsequently named YFP and CFP throughout the text) a Hind III/BamHI cDNA fragment containing the entire coding region from HERG was cloned into pEYFP-C1 and pECFP-C1 vectors (Clontech) in-frame with the fluorescent protein sequence. For this purpose a forward primer containing a HindIII recognition site and the coding sequence corresponding to HERG amino acids 1–7 (5'-GGAAGCTTTCATGCCGGTGGGAGGGCCAC-3') was used in PCR reactions with a reverse primer containing the coding sequence corresponding to amino acids 370–378 and covering the unique BstEII site. The resulting PCR product was digested with HindIII/BstEII, gel

purified and ligated into HindIII/BstEII-digested wild-type HERG in the pSP64A+ vector. The purified HindIII/BamHI fragment obtained from this construct was subsequently cloned into the pEYFP/ECFP-C1 vectors.

A similar strategy was used to generate C-terminally labeled HERG channels using the pECFP-N1 and pEYFP-N1 vectors (Clontech). In this case it was necessary to construct first a HERG cDNA with an EcoRI recognition site instead of the stop codon at the end of the coding sequence. A forward primer containing the coding sequence corresponding to amino acids 859–867 was used in PCR reactions with a reverse primer containing the coding sequence for amino acids 1151–1159 and the EcoRI recognition site (5'-GGGAATTCTGCCGGTCCG-AGCCGTGTCTGTG-3'). The resulting PCR product was digested with SacI/EcoRI, purified and ligated into the corresponding sites of wild-type HERG. Finally the Hind III/EcoRI cDNA fragment from this modified construct was cloned into the pECFP/EYFP-N1 vectors.

The HERG channels with CFP or the venus variant of YFP (VFP) inserted at different internal positions of the coding sequence were obtained by random insertion with an *in vitro* transposition system using a Tn5-derived hyperactive transposon carrying the fluorescent protein coding sequence for CFP or VFP as previously described [40,41]. These two transposons (TcPT-1 encoding CFP and TvPT-0 encoding VFP) use different reading frames to increase the chance of insertion yielding functional proteins [40]. Given the low probability of transposition in an *in vitro* reaction, the transposons also include as selective marker a kanamycin resistance gene (*Kanr*) flanked by SrfI restriction sites that can be used to subsequently remove it. Two independent *in vitro* transposition reactions, one for each transposon, were carried out containing molar equivalents of the PCR-amplified transposon and the target plasmid (carrying the cDNA of wild type HERG) with EZ::TN transposase (Epicentre Technologies). After the transposition reaction and transformation, the transposed clones expressing dual antibiotic resistance to ampicillin (transformed clones) and kanamycin (marker for transposition) were transiently expressed in HEK293 cells to identify and select correctly orientated in-frame insertions by following the appearance of fluorescent fusion proteins. The *Kanr* cassette was further removed by digestion with SrfI and religation to obtain the full-length fusion constructs. Sequencing and transient expression of each fusion protein was used to confirm proper insertion of the fluorescent protein into the HERG coding sequence and correct folding of the fluorophore regardless of the insertion site. Two collections of HERG fluorescent fusion proteins containing either CFP or VFP randomly inserted all along the channel coding sequence were thus generated. Additionally, some of the fluorescent fusion channel constructs from each collection were subsequently used as a base for the generation of identical constructs carrying the complementary fluorophore. For this purpose, PCR fragments containing the coding sequence of CFP and VFP fluorescent proteins were generated using as template the plasmids containing both transposons [40]. After digestion with *Ascl* and *SrfI* these PCR products were finally used to replace in the fluorescent fusion channel constructs the corresponding *Ascl/SrfI* fragment containing the complementary fluorophore.

To generate HERG channels N and C-terminally double labeled with both CFP and VFP fluorescent proteins, HindIII–BstEII restriction fragments from channel fusion constructs carrying the fluorescent label located in the amino end were used to replace the corresponding segment in HERG fluorescent constructs having the complementary fluorophore in the carboxy end. In other cases, BstEII–BamHI fragments from fluorescent fusion channels containing the fluorophore in the C-terminal domain were used to replace the corresponding wild type fragment in constructs carrying the complementary fluorophore in the N-terminal region.

### 2.2. Cell culture and transfection

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<sub>2</sub> and plated in 35-mm diameter tissue culture plastic dishes

containing sterile glass coverslips coated with poly-L-lysine, that constituted the bottom of a recording chamber for electrophysiological and FRET measurements. The culture medium consisted of Dulbecco's modified Eagle's medium nutrient mixture F-12 Ham's (DME/F12 1:1 mixture, Sigma) supplemented with 100 U/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin and 10% fetal bovine serum. Cells trypsinized 24 h prior to transfection seeded on poly-L-lysine-coated coverslips were transiently transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) with 2–5 µg of plasmid DNA containing either the individual constructs or the co-transfected CFP- and V/YFP-labeled constructs in an approximately 1:3 relationship to maintain a proper molar ratio of expressed donor and acceptor fluorophores, ensuring that most of the cells contained at least one acceptor-labeled subunit per donor molecule. The mixture of DNA and Lipofectamine was incubated in serum-free medium for 20 min and added to the plates with the cells in serum-containing medium without antibiotics. Recordings were typically performed 24–48 h after transfection. Electrophysiological characterization of the constructs was systematically performed in transfected HEK293 cells because they are easier to patch and remain more stable during recordings. As previously reported [47] additional non-HERG outward currents are frequently detected in these cells during depolarizing steps, in which the magnitude and the degree of inactivation and/or rectification of the elicited currents are highly variable. However, the contribution of the endogenous currents is negligible along the tail current time course. Therefore, by limiting the analysis to the tail currents, only HERG current characteristics would be analysed. Since analogous current parameters were obtained when CHO cells were used, data from both cell types were pooled in the Tables. Due to their higher transfection efficiency providing an easier co-localization of several cells in the microscopy field, transfected CHO cells were typically used for FRET measurements.

### 2.3. Acquisition and analysis of ionic current data

Ionic current recordings in HEK293 and CHO cells were performed at room temperature in the whole-cell configuration of the patch-clamp technique. To improve the quality of the seals and the stability of the recordings, cells were sometimes mildly trypsinized and seeded on poly-L-lysine-coated coverslips to be used for analysis within 2–6 h. No change in the qualitative or quantitative characteristics of the cell currents was introduced by this procedure. Patch pipettes with tip resistances of 3–5 MΩ were pulled from borosilicate or Kimax disposable micropipettes (Boralex, Rochester Scientific, NY; Fisherbrand, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA or Kimble glass Inc. Vineland, NJ). The standard extracellular saline contained (in mM): 137 NaCl, 4 KCl, 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 glucose, and 10 HEPES (pH 7.4 with NaOH). The pipette solution contained (in mM): 140 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 0.7 CaCl<sub>2</sub>, 1.1 EGTA, and 10 HEPES (pH 7.4 with KOH). An EPC-7 patch-clamp amplifier (HEKA Elektronik, Lambrecht, Germany) was used to record membrane currents. Stimulation and data acquisition were controlled with the Pulse+ PulseFit software (HEKA Elektronik) running on Macintosh computers. Ionic currents sampled at 1 kHz were elicited using the voltage protocols indicated in the figures. Data analysis and exponential fits to ionic currents were performed with the programs PulseFit and Igor-Pro (WaveMetrics Inc., Lake Oswego, OR, USA). A P/n method was used for leak and capacitive current subtraction. Kinetic parameters of activation and deactivation were obtained as previously described [21,38,47]. When tail current analysis was used for studying activation voltage dependence, tail current magnitudes normalized to maximum following 1 s depolarizations were fitted with a Boltzmann function to estimate the half-activation voltage ( $V_{\text{half}}$ ) and equivalent gating charge ( $z_g$ ):

$$I_{\text{tail}}/I_{\text{max}} = 1 / [(1 + \exp((V_{\text{half}} - V)z_g F / RT))] \quad (1)$$

where  $V$  is the test potential and  $F$ ,  $R$  and  $T$  are Faraday constant, gas constant and absolute temperature, respectively. The time course of

activation was monitored using an indirect envelope of tail current protocol [21,38,47], varying the duration of the depolarization pulse and following the variation in the magnitude of the tail currents recorded after going back to a negative voltage. The time necessary to reach a half-maximal tail current magnitude was used to compare the speed of activation of the different channels. Deactivation parameters were obtained from tail currents upon membrane repolarization at the indicated potentials, following 1 s depolarization pulses to +40 mV that displaced the channels to open (and inactive) states. The time constants of deactivation were determined from negative-amplitude biexponential fits to the decaying phase of the tail currents using a function of the form:

$$Y = A_f \exp(-T/\tau_f) + A_s \exp(-T/\tau_s) + C \quad (2)$$

where  $\tau_f$  and  $\tau_s$  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 this case, the first cursor of the fitting window was advanced to the end of the initial hook due to the recovery of inactivation.

### 2.4. FRET measurements

FRET measurements were performed in CHO cells bathed in standard extracellular saline following the increase (dequenching) in donor (CFP) fluorescence signal during incremental photobleaching of acceptor (V/YFP). Background fluorescence of both fluorophores was determined from a region of the same field located outside the cell and the averaged pixel intensity of this area was subtracted from the mean intensities measured in the regions of interest corresponding to the individual fluorescent cell areas. A Zeiss Axiovert 100 microscope with a 40x/0.75 Plan-Neofluar objective (Carl Zeiss) was used. The fluorescence imaging system (Till-Photonics, Gräfelfing, Germany) consisted of a monochromator Polychrome IV, a dual band CFP/YFP filter set and a 12-bit CCD camera (IMAGO) combined with a DUAL-View Micro-Imager (Optical Insights, Santa Fe, USA) for dual emission image acquisition. Control of monochromator and camera as well as image recording and processing were performed with TILLvisION software (Till-Photonics). The standard acceptor bleach protocol consisted of 30 cycles every 2 s with 50–100 ms of exposure of donor and acceptor near their excitation maximum (at 440 and 515 nm, respectively) to detect CFP and V/YFP fluorescence without V/YFP-bleaching, followed by 180–240 additional cycles separated by periods in which the V/YFP remains permanently illuminated at 515 nm to photobleach it. Linear regression was used to obtain the steady-state values of FCFP increase from scatter plots of CFP fluorescence increase versus FYFP decrease with incremental bleaching for each cell. Photoconversion of V/YFP into CFP-like species was negligible under our photobleaching conditions as evidenced by the total absence of fluorescence in the CFP channel when cells expressing exclusively V/YFP-labeled proteins were submitted to the standard acceptor bleaching protocol. Individual cells showing dim fluorescence leading to very low signal-to-noise ratios and those in which the fluorescence of V/YFP did not average at least 13 or 10 fold that of the lower intensity CFP probe, respectively (see below), were discarded to prevent low acceptor-to-donor ratio contributing to uncontrolled and reduced FRET signals. This implies that almost exclusively 2:2 and/or 1:3 CFP:V/YFP-tagged subunit stoichiometries will contribute to FRET in the HERG tetrameric structure. Quantitative FRET levels were expressed as FRET efficiency ( $E_{\text{FRET}}$ ), defined as the proportion of the excited states of the donor that become transferred to the acceptor. As previously pointed out [43,46,48,49] the true or “maximal” FRET efficiency can be obtained from donor dequenching fluorescence data as the product of the measured or “apparent” efficiency and  $\alpha_D$ , the

fraction of total donor molecules forming donor-acceptor complexes, according to the expressions:

$$E_{\text{FRET}} = E_{\text{FRET (APP)}} \alpha_D = [1 - (F_{\text{DA}}/F_D)] \alpha_D \quad (3)$$

in which  $F_{\text{DA}}$  and  $F_D$  are the fluorescence intensities of the donor before and after complete photobleaching of the acceptor, respectively, and  $\alpha_D$  would correspond to  $\text{DA}/(\text{D}+\text{DA})$  or the fraction of donor-acceptor complexes (DA) with respect to total donor molecules [free (D) plus complexed (DA) donors]. In our case, the contribution of the  $\alpha_D$  factor was minimized i) systematically converting the fluorescence intensities into molar ratios by normalizing the intensity ratios to those of a donor-acceptor tandem imaged at the same settings, and excluding from the analysis those cells showing a low acceptor to donor ratio, and ii) by systematic subtraction of signals coming from donor molecules co-expressed with non-interacting acceptor pairs. Measuring donor fluorescence changes as a function of time during the bleaching process and extrapolation of fluorescence intensity to zero acceptor level [45,50] also eliminated the influence of incomplete acceptor bleaching [49] in donor fluorescence increases.

To estimate distances from the intrasubunit FRET measurements the conventional formulas

$$E_{\text{FRET}} = R_0^6 / (R_0^6 + d^6) = (R_0/d)^6 / 1 + (R_0/d)^6 \quad (4)$$

and

$$d = R_0 (E_{\text{FRET}}^{-1} - 1)^{1/6} \quad (5)$$

were used in which  $d$  corresponds to the interfluorophore distance and  $R_0$  (the Förster distance) is the distance at which the FRET efficiency ( $E_{\text{FRET}}$ ) is 50%.  $R_0$  was taken as 5 nm for the CFP:V/YFP pair [48,51,52] assuming an orientation factor of 2/3 corresponding to a random interfluorophore orientation. Unless otherwise indicated the distance estimates from the FRET efficiencies were interpreted in a two-dimensional way by assuming that the fluorophores located at identical positions in different subunits were located in an  $x$ - $y$  plane parallel to the cell membrane due to maintenance of a fourfold symmetry of the channels around the central pore.

Due to the several geometries adopted by the fluorophores in the tetrameric channel structures, two general situations were considered for the  $E_{\text{FRET}}$  expressions as a function of the donors and acceptors present in a single oligomeric molecule [53,54]. Thus, for the case of a donor surrounded by several acceptors at distances  $d_1$  to  $d_n$ , the averaged  $E_{\text{FRET}}$  is given by:

$$E_{\text{FRET}} = \frac{[R_0^6 (1/d_1^6 + 1/d_2^6 + \dots + 1/d_n^6)]}{[R_0^6 (1/d_1^6 + 1/d_2^6 + \dots + 1/d_n^6)]} \quad (6)$$

also meaning that for  $n$  equivalent acceptors at the same distance, an operational  $nR_0^6$  factor can be used. On the other hand, for several donors surrounding one acceptor, the averaged  $E_{\text{FRET}}$  is the average of the transfer efficiency originating from each donor:

$$E_{\text{FRET}} = [E_{\text{FRET}}(D_1) + E_{\text{FRET}}(D_2) + \dots + E_{\text{FRET}}(D_n)]/n \quad (7)$$

or

$$E_{\text{FRET}} = 1/n [(R_0/d_1)^6 / 1 + (R_0/d_1)^6 + ((R_0/d_2)^6 / 1 + (R_0/d_2)^6 + \dots + ((R_0/d_n)^6 / 1 + (R_0/d_n)^6)] \quad (8)$$

Application of these mathematical expressions to different donor:acceptor combinations and determination of the corresponding  $E_{\text{FRET}}$  vs. distance curves are detailed in the figures. Equivalent expressions and procedures for the estimation of vertical distances between the square planes delimited by fluorophores located in two different positions are also shown in the figures. According to the

Pythagorean theorem, the interfluorophore distance for two diagonally located labels in the same plane will correspond to  $1.4142d$  in which  $d$  represents the adjacent distance between fluorophores arranged in a quadratic symmetrical way and 1.4142 stands for the square root of 2. Equivalent triangulations using the Pythagorean theorem were performed to calculate interfluorophore distances as a function of the vertical separation between the planes delimited by labels introduced in two different positions of the channel sequence.

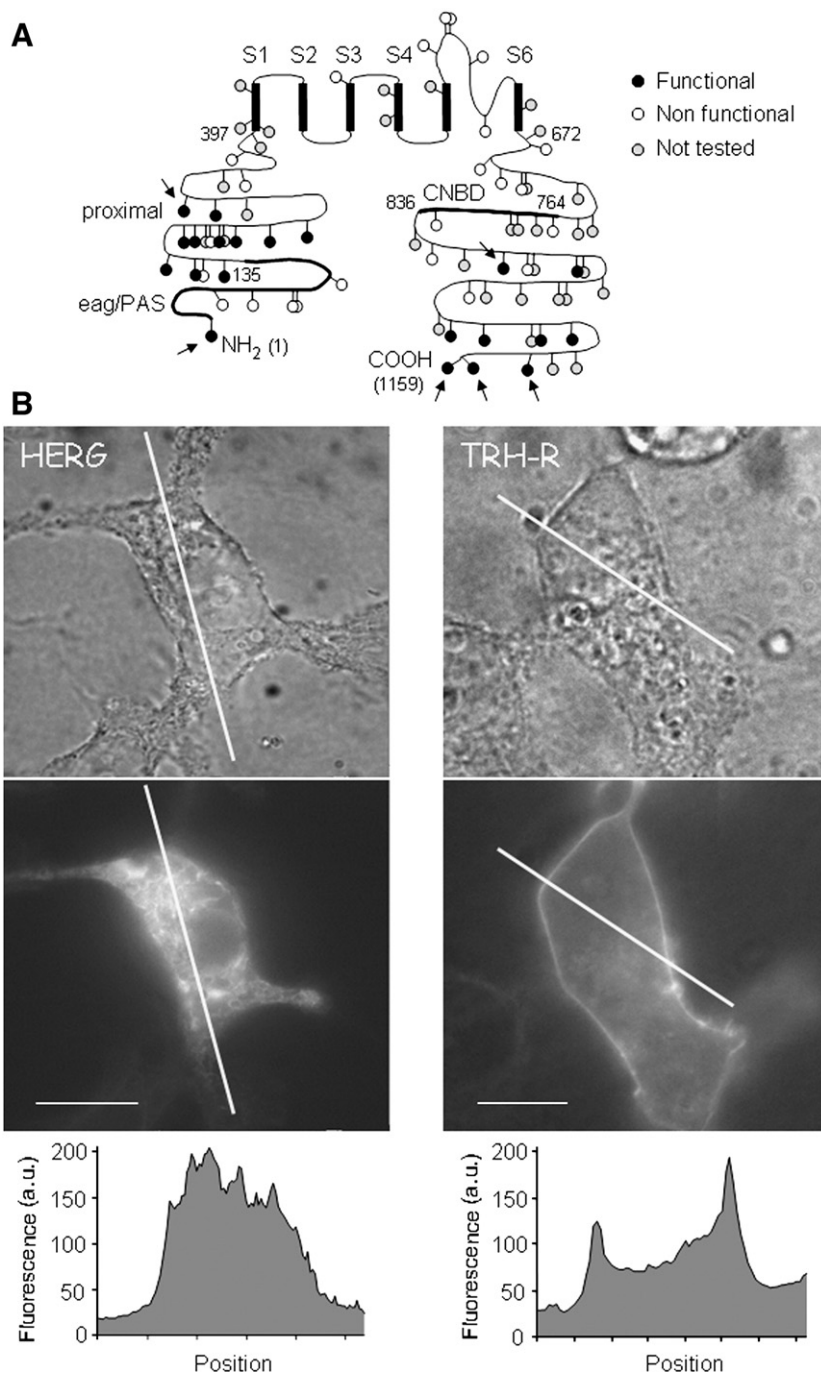
## 2.5. Statistics

All data are presented as the mean  $\pm$  S.E.M. for  $n$  number of cells and the number of transfections indicated by  $N$ . Statistical significance was tested with the unpaired two-tailed Student's  $t$ -test. Extrapolation of  $E_{\text{FRET}}$  deviations to distance error values was performed applying the propagation of errors method to the distance estimations using the aforementioned equations and the experimentally determined  $E_{\text{FRET}}$ . The uncertainty calculator (<http://www.takesomeshortcuts.com/sigdig/sigdig.shtml>) was used for this purpose.

## 3. Results

### 3.1. Generation and functional expression of libraries of fluorescent HERG fusion proteins with cyan and yellow variants of GFP

To obtain a number of constructs carrying fluorescent proteins inserted into multiple sites of the HERG channel protein large enough to support our experimental approach, we used a transposon-based technique in which the sequence of either the cyan fluorescent protein (CFP) or the venus variant of the yellow fluorescent protein (VFP) contained in a modified hyperactive Tn5 transposon were randomly inserted into the HERG coding sequence by in vitro transposition reactions ([40,41]; see also **Materials and methods** for details). When these transposons were inserted into the HERG coding sequence in the correct orientation and reading frame they produced fluorescent channel fusion proteins. Following in vitro transposition reactions, transformation and selection of successfully transposed clones, we initially screened 1728 clones (864 CFP and 864 VFP transposed recombinants) for fluorescence by transient expression in HEK293 cells. From the 189 constructs that produced fluorescent fusion proteins, 68 recombinants were discarded due to insertions out of the HERG sequence or being inversely oriented or out-of-frame. This yielded 121 correct insertions (7% of the transposed clones) from which 44 additional recombinants were also discarded due to duplication of the insertion position. Thus, we finally obtained two collections of HERG fusion proteins with 37 unique insertions of CFP and 40 of VFP (Fig. 1A and Table 1). In our system, taking into account the size of the HERG cDNA target sequence (3500 bp) and the GW1-CMV plasmid vector carrying it (8650 bp), a random transposition would be expected to result in an in-frame correctly orientated insertion into the HERG coding region with a probability of 6.7%. This percentage value compares favourably with the 7% of correct insertions obtained. Nevertheless, it is important to note that once the duplicated insertions are discarded, only 4.4% of the recovered fusion proteins correspond to unique insertions. This is consistent with the not entirely random behaviour of the Tn5 transposon, showing a preference for some particular locations that tends to limit the number of unique insertions recovered within a given target sequence [40]. It is important to note also that the transposition process involves a duplication of the 9 bp flanking the transposon insertion site. This generates a three amino acid duplication that adds to the linker flanking the fluorescent protein [40]. Therefore we identified the insertion site in the HERG coding region by the number of the amino acid residue preceding the inserted amino acid triplet. Interestingly, the 77 constructs carrying in-frame CFP or VFP protein



**Fig. 1.** Schematic representation of a HERG channel subunit showing the position of fluorophore insertions (A) and differences in cellular localization of HERG and TRH-R fluorescent fusion proteins in living cells (B). (A) Localization of CFP or V/YFP insertions into the different regions of the HERG subunit. Refer to Table 1 for the exact position in the sequence where the insertions occurred and the type of fluorophore used for labeling. Different regions/domains in the channel molecule are highlighted and signaled with numbers, corresponding to the amino terminal EAG/PAS and proximal domains (residues 1–135 and 136–397, respectively), the central channel core (residues 397 to 672) including S1 to S6 transmembrane helices and the pore region between S5 and S6, and the CNBD (residues 764–836) in the carboxy terminus that extends up to residue 1159 [21,25]. Black circles, functional constructs; white circles, non functional constructs; gray circles, not tested in the functional screening. The transposon-derived insertions and those introduced in the amino and carboxy ends by conventional cloning procedures are shown. The five positions subsequently used for FRET measurements are marked with arrows. (B) HEK293 cells were transiently transfected with expression plasmids encoding HERG channels labeled with YFP in the amino terminus and TRH receptors fused at the carboxy end to GFP. Cells were imaged by standard bright field (top) and epifluorescence (middle) microscopy. Fluorescence intensity profiles along the depicted white line are shown at the bottom. Calibration bars: 10  $\mu$ m. A.u.: arbitrary units.

labels at different positions along the HERG coding sequence yielded in all cases fluorescent fusion proteins indicating that, as previously reported, GFP variants are able to fold properly and form a fluorophore after insertion in a variety of protein backgrounds [40,41]. The distribution of the insertions shown in Table 1 (in which the eight labeled variants obtained by conventional fluorescent labeling are also listed), indicates that they are spread over most of

the HERG coding sequence (see also Fig. 1A). Five and seventeen insertions corresponded to the EAG and the proximal domains, respectively, with four additional insertions located up to the beginning of the first transmembrane helix around residue 400 [25]. This means a total of 26 insertions (33.7%) covering the initial 400 residues (34.5%) of the channel protein that correspond to the amino terminal region. Fourteen constructs (18.1%) had insertions in

**Table 1**  
Characteristics of the fluorescent HERG fusion proteins

Construct #	Insertion site (residue #) <sup>a</sup>	Fluorescent protein	Functional expression <sup>b</sup>	HERG domain
<b>1</b>	<b>1 (Amino end)</b>	<b>CFP</b>	Yes	EAG
<b>2</b>	<b>1 (Amino end)</b>	<b>YFP</b>	Yes	EAG
3	43	VFP	No	EAG
4	78	CFP	No	EAG
5	87	VFP	No	EAG
6	88	VFP	No	EAG
7	104	VFP	No	EAG
8	144	VFP	Yes	Proximal
9	158	VFP	No	Proximal
10	162	CFP	Yes	Proximal
11	195	CFP	Yes	Proximal
12	213	VFP	Yes	Proximal
13	219	VFP	Yes	Proximal
14	226	VFP	–	Proximal
15	227	CFP	No	Proximal
16	231	VFP	Yes	Proximal
17	232	CFP	–	Proximal
18	237	CFP	Yes	Proximal
19	251	VFP	Yes	Proximal
20	264	VFP	Yes	Proximal
21	314	CFP	–	Proximal
22	329	CFP	Yes	Proximal
23	345	CFP	Yes	Proximal
<b>24</b>	<b>345</b>	<b>VFP</b>	Yes	Proximal
25	376	VFP	–	Proximal-S1
26	379	CFP	No	Proximal-S1
27	379	VFP	No	Proximal-S1
28	390	CFP	–	Proximal-S1
29	399	CFP	–	S1 helix
30	408	CFP	–	S1 helix
31	411	VFP	–	S1 helix
32	422	CFP	–	S1 helix
33	515	CFP	No	S3–S4 loop
34	526	CFP	–	S4 helix
35	535	CFP	–	S4 helix
36	556	CFP	–	S5 helix
37	580	VFP	No	S5–Pore loop
38	596	CFP	No	S5–Pore loop
39	598	VFP	No	S5–Pore loop
40	603	VFP	No	S5–Pore loop
41	626	VFP	No	Pore
42	649	CFP	–	S6 helix
43	671	VFP	–	S6–CNBD linker
44	673	VFP	No	S6–CNBD linker
45	696	VFP	No	S6–CNBD linker
46	708	CFP	No	S6–CNBD linker
47	718	VFP	No	S6–CNBD linker
48	719	CFP	–	S6–CNBD linker
49	742	CFP	–	S6–CNBD linker
50	755	CFP	–	S6–CNBD linker
51	760	CFP	–	S6–CNBD linker
52	766	VFP	No	CNBD
53	772	CFP	–	CNBD
54	776	VFP	–	CNBD
55	778	CFP	–	CNBD
56	828	CFP	No	CNBD
57	846	CFP	–	COOH terminal
58	857	VFP	No	COOH terminal
59	878	VFP	–	COOH terminal
<b>60</b>	<b>905</b>	<b>CFP</b>	Yes	COOH terminal
61	905	VFP	Yes	COOH terminal
62	911	VFP	No	COOH terminal
63	913	VFP	–	COOH terminal
64	936	VFP	Yes	COOH terminal
65	938	CFP	–	COOH terminal
66	947	VFP	–	COOH terminal
67	961	CFP	–	COOH terminal
68	963	CFP	–	COOH terminal
69	976	VFP	–	COOH terminal
70	988	VFP	–	COOH terminal
71	993	CFP	No	COOH terminal
72	1025	CFP	–	COOH terminal
73	1030	CFP	Yes	COOH terminal
74	1040	VFP	Yes	COOH terminal
75	1062	CFP	–	COOH terminal

**Table 1 (continued)**

Construct #	Insertion site (residue #) <sup>a</sup>	Fluorescent protein	Functional expression <sup>b</sup>	HERG domain
76	1065	VFP	Yes	COOH terminal
77	1082	VFP	Yes	COOH terminal
78	1102	VFP	–	COOH terminal
79	1116	VFP	–	COOH terminal
80	1123	CFP	Yes	COOH terminal
<b>81</b>	<b>1123</b>	<b>VFP</b>	Yes	COOH terminal
<b>82</b>	<b>1158</b>	<b>CFP</b>	Yes	COOH terminal
83	1158	VFP	Yes	COOH terminal
<b>84</b>	<b>1159 (Carboxy end)</b>	<b>CFP</b>	Yes	COOH terminal
<b>85</b>	<b>1159 (Carboxy end)</b>	<b>YFP</b>	Yes	COOH terminal

Protein constructs obtained by conventional fluorescent labeling are marked in bold.

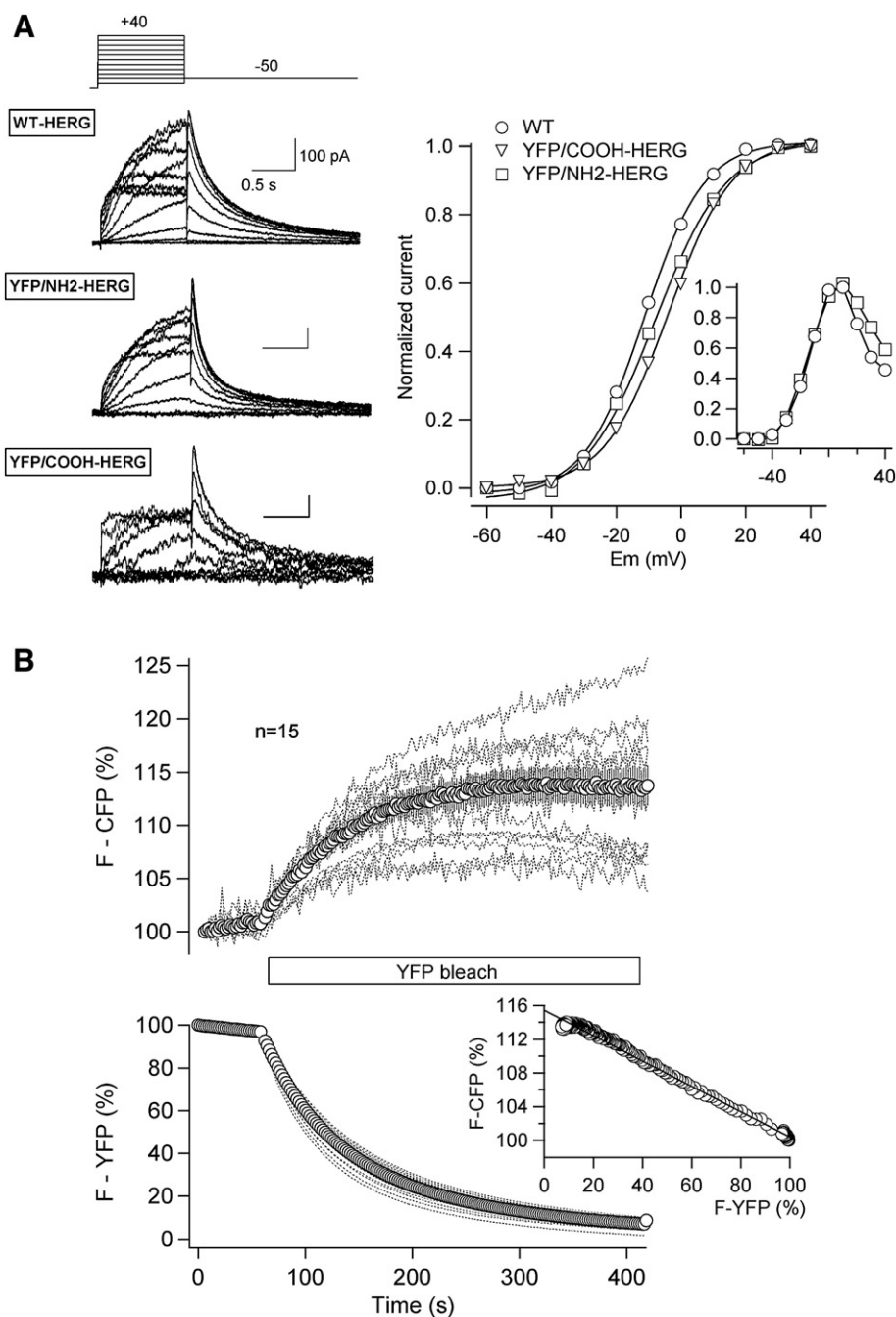
<sup>a</sup> Residue immediately before insertion except for the amino end.

<sup>b</sup> – Not determined

the transmembranal channel core extending from residues 400 to 670 (270 residues or 23.3% of the 1159 HERG amino acids). Finally, nine constructs hold insertions in the linker between the S6 transmembrane segment and the cyclic-nucleotide binding domain (CNBD), five insertions were in the CNBD, and the remaining twenty-three were in the remaining COOH terminus of the HERG sequence. This means that 48% of the insertions are located within the 42.1% of the protein corresponding to the carboxy terminus beyond residue 670. Notably, almost no insertions were recovered in the segment between the beginning of the S1 helix and the S3–S4 loop. If this absence is due to the not totally random behaviour of the Tn5 transposon or is the result of aberrant proteins that are rapidly removed by cell degradation, remains to be established.

One of the main goals of this work was to obtain some indications about the *in vivo* structural organization of HERG. Although the impairment of specific protein functions upon the introduction of fluorescent labels in defined positions could yield information about the relevance of specific domains/structures for normal channel functionality, we sought to select for further work only fluorescent constructs able to form functional channels at the plasma membrane. Apart from demonstrating the presence of properly assembled HERG channels in the membrane, the detection of characteristic and robust HERG currents excludes the occurrence of major defects in folding, tetramerization and trafficking, or the presence of gross structural alterations as a result of fluorophore insertion. In our case, this became particularly important because, as shown in Fig. 1B and unlike the distinct fluorescent ring at the cell perimeter exhibited by cells expressing another typical membrane protein (the thyrotropin-releasing hormone receptor labeled with GFP variants in the carboxy terminal end), only a diffuse fluorescence pattern showing a reticular distribution throughout the cell sparing the nucleus was systematically observed in the fluorescent HERG-labeled expressing cells, regardless of the construct used. Such a pattern was obtained both in CHO and HEK293 cells and did not significantly change up to 72 h after transfection. We then tested by patch-clamp the function of 50 different constructs (Table 1), corresponding to 43 internal insertions and also to those channels terminally labeled on the amino and carboxy ends (see Methods).

The results of the electrophysiological screening summarized in Table 1 indicate that, except for the label introduced at the amino terminal end of the protein, HERG-like currents are not detectable with any of the five fusion constructs carrying the fluorophore in the EAG/PAS domain extending up to residue 135. In contrast, 11 of the 13 positions tested corresponding to the proximal domain (located between residues 136 and 373 of HERG), yielded typical HERG currents (see also below) when tested electrophysiologically. Remarkably, no detectable ionic currents were observed upon expression of other constructs with insertions up to residue 905 of the carboxy terminal region. This included the five fusions carrying the fluorophore extracellularly either at residue 515 corresponding to the S3–S4 loop, or at



**Fig. 2.** Functional characteristics of HERG channels labeled with CFP and V/YFP in the amino and carboxy terminal ends and quantification of FRET signals by acceptor photobleaching. (A) Comparison of WT and fluorescent HERG functional characteristics in transfected HEK293 cells expressing channels with or without the fluorescent protein fused to the amino (YFP/NH<sub>2</sub>-HERG) or the carboxy (YFP/COOH-HERG) ends, either before residue 1 or following residue 1159. Representative ionic currents in response to the indicated voltage protocol are shown on the left. Fractional activation curves obtained by standard tail current analysis in the same cells are shown on the right. I vs. V curves normalized to maximum for currents at the end of the depolarization step generated from cells expressing WT and YFP/NH<sub>2</sub>-HERG channels are shown in the inset. (B) Determination of donor fluorescence recovery during disruption of energy transfer by selective acceptor photobleaching. Transiently transfected CHO cells were imaged for co-expressed HERG amino terminally fused to CFP and YFP as indicated in Methods. Shown are the relative increases in CFP intensities (in percentages) over initial levels and the remaining fluorescence intensity of YFP. The symbols represent the calculated mean  $\pm$  SEM, whereas the thin lines correspond to single cell traces. The acceptor was bleached as indicated by the box. A linear regression analysis of donor recovery vs. fractional acceptor photobleach is depicted in the inset.

positions 580, 596, 598 and 603, all located in the linker between S5 and the pore loop. On the other hand, a complete lack of functional expression was also obtained for all tested fusions carrying the labels in the segment linking the sixth transmembrane helix and the CNBD or in the CNBD domain itself. However, prominent HERG-type currents were observed in 10 out of 13 tested positions carrying insertions in the C-terminal segment that extends from amino acid 905 to the carboxy end corresponding to residue 1159.

### 3.2. Implementation of a FRET system to detect intersubunit interactions between functional HERG channels fluorescently labeled in the amino and carboxy termini

The relative positions of the HERG N- and C-terminal structures and their relationship to the channel core are unknown. It has been proposed that interactions between the initial part of the EAG domain and the S4–S5 linker are involved in slowing HERG closing, and that



this linker could act as a docking site for the N-terminal region to modulate activation gating [18,22,29,31,35]. According to this idea and due to the short length of the HERG S4–S5 linker, we reasoned that (unless the four-fold symmetrical organization is not maintained), the initial segments of the four amino termini should lie relatively close and packed below the central transmembrane pore structure. Therefore, we started generating and characterizing N-terminal fusion constructs of HERG with CFP and YFP that could help us to implement a FRET system useful in assessing the predicted proximity of the co-expressed subunits. Additionally, fluorescent channels labeled at the C-terminus were also constructed for comparison.

Labeling N- and C-termini with CFP and YFP yielded totally functional fusion channels as demonstrated by the appearance of typical HERG-like currents in HEK293-(Fig. 2A) and CHO-(not shown) transfected cells. These currents showed similar activation voltage dependence and inward rectification properties as those of unlabeled channels (Fig. 2A and Table 2). However, the N-terminal fluorescent channels showed faster deactivation kinetics. Thus, the values of deactivation time constants for the major fast deactivation current component upon repolarization at  $-50$  and  $-100$  mV were significantly reduced in the presence of the amino terminal fluorophore, but not in the constructs carrying the fluorescent protein at the end of the HERG sequence at positions 1158 or 1159 (Table 2). The behaviour of the N-terminally labeled channels is equivalent to that obtained after introduction of a short HA epitope at the beginning of the amino terminus [39] and mimics the accelerations of deactivation caused by impairment of the EAG/PAS domain due to deletion of the initial sixteen residues [22,35] or the complete domain ( $\Delta 2-135$  channels, ref. [18]). Altogether, these results indicate that the labeled subunits reliably reproduce the normal assembly and function of the unlabeled HERG channels.

To detect and quantify FRET signals, we measured the increase in donor (CFP) emission during selective photobleaching of the acceptor fluorophore (YFP) under static conditions. Thus the recovery of donor fluorescence emission (a measure of steady-state FRET efficiency) was monitored and expressed as the percentage of CFP emission during the acceptor bleach. As shown in Fig. 2B, direct recording of CFP and YFP fluorescence signals from N-terminally labeled HERG constructs at successive time points after the onset of YFP photobleaching, reveals an increased CFP fluorescence emission concomitant with progressive YFP bleaching, which is direct evidence for FRET. Plotting normalized CFP fluorescence against that of YFP also indicated that the extent of CFP recovery linearly correlated with decaying YFP fluorescence (inset of Fig. 2B). As an indication of FRET efficiency, the extrapolated intersection of the linear regression line with the y axis at FYFP=0 yielded an FCFP increase of  $15.64 \pm 1.34\%$  ( $n=15$ ) that corresponds to a

FRET efficiency of  $13.53 \pm 1.16$  (see Methods). These data demonstrate the existence of a substantial FRET between the N-labeled subunits of HERG, suggesting a relatively close packing of their amino terminal structures in the tetramer.

To demonstrate that the recorded FRET signals are due to properly assembled HERG complexes and not to unordered aggregates formed in defined cell compartments or to random encounters between diffusing overexpressed channel subunits, we performed some additional controls. Although the detection of robust HERG currents unequivocally demonstrates the presence of properly assembled fusion proteins in the plasma membrane, the diffuse fluorescence pattern consistently observed in HERG-expressing cells (see above), made it necessary to ensure that the detected FRET signals were not mainly due to miss-assembled channels retained in intracellular structures. As shown in Fig. 3A for an illustrative construct, the averaged FRET efficiency was indistinguishable when the determination was performed using the total cell area, the central part of the cells, or only the region corresponding to the outer border, mostly representing the plasma membrane. Statistically equivalent FRET values were observed when data derived from whole cell images were compared with those of the same construct, using the fluorescence signals detected at the tip of patch pipettes carrying membrane patches excised from the fluorescent HERG-expressing cells (Fig. 3B).

As a further demonstration of FRET coming from specifically assembled protein complexes, we always verified that the FRET efficiency did not significantly vary with different CFP or YFP fluorescence intensities, and that it was independent of the channel density and/or the expression levels over a wide range (Fig. 3C). Only experiments and channel constructs showing a similar absence of correlation between measured  $E_{\text{FRET}}$  and fluorochrome expression levels were subsequently considered for analysis. Finally, as shown in Fig. 3D, the FRET efficiency became much lower than that obtained with N-terminally labeled pairs after using two presumably non-interacting proteins, namely HERG channels and the rat vanilloid receptor VR1, both labeled in the amino terminus [ $3.78 \pm 0.45$  ( $n=76$ ) vs.  $13.53 \pm 1.16$  ( $n=15$ );  $P<0.0001$ ], or the TRH receptor and HERG also labeled at the amino end (not shown). This indicates that FRET is only observed between labeled subunits assembled in one channel but not between merely co-localized subunits. It also defines a lower limit of  $E_{\text{FRET}}$  below 4 as an indication of FRET not coming from specific homotetrameric assembly of HERG channel subunits.

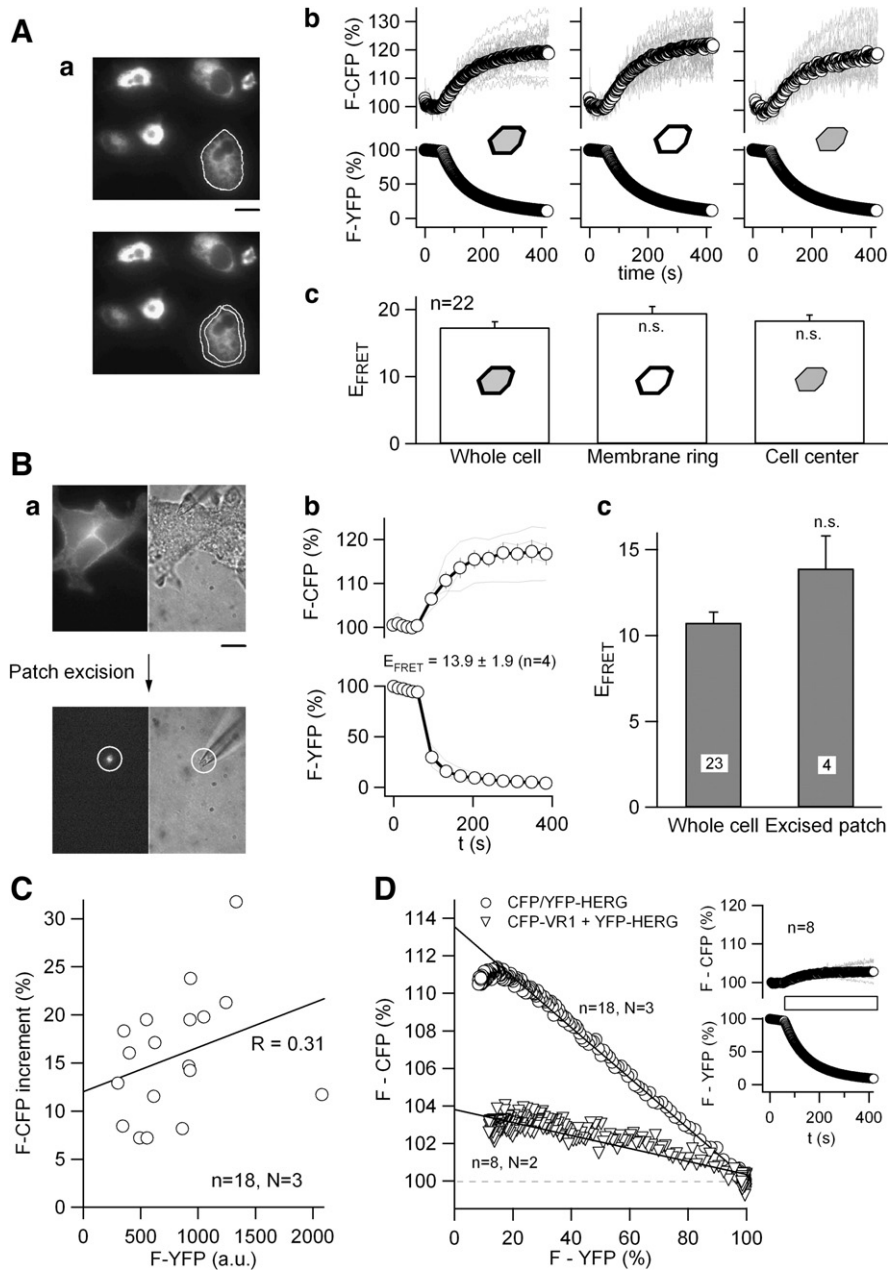
Next, we assessed FRET efficiency upon the expression of C-terminally labeled HERG constructs either alone or in combination with N-terminal fusion constructs. Currents analogous to those mediated by native HERG channels were obtained in cells expressing fluorescent channels labeled at the C-terminus either at position 1159

**Table 2**  
Electrophysiological characteristics of the fluorescent HERG fusion proteins

Label position and/or transfection	$V_{0.5}$ (mV)	$Z_C$	Activation $t_{0.5}$ (ms)		Deactivation $\tau$ (MS)			n
			(0 mV)	(+20 mV)	(-50 mV)		(-100 mV)	
					Fast	Slow	Fast	
Wild-type	$-2.2 \pm 2.8$	$2.2 \pm 2.8$	$465 \pm 56$	$152 \pm 6$	$176 \pm 23$	$1190 \pm 51$	$63 \pm 10$	3–12
1	$-7.8 \pm 1.4$	$2.3 \pm 0.2$	$305 \pm 31$	–	$63 \pm 5^a$	$386 \pm 20^a$	$18 \pm 2^a$	3–11
345	$-16.6 \pm 1.9^a$	$2.5 \pm 0.2$	$226 \pm 25^a$	–	$120 \pm 10$	$856 \pm 106^a$	$30 \pm 10$	4
905	$-20.9 \pm 4.5^a$	$2.2 \pm 0.1$	$218 \pm 35^a$	–	$136 \pm 7$	$1195 \pm 131$	$40 \pm 22$	3
1123	$-4.0 \pm 3.9$	$2.3 \pm 0.3$	$271 \pm 19^a$	–	$150 \pm 27$	$873 \pm 30$	$42 \pm 2$	5
1158	$-9.0 \pm 1.3$	$1.9 \pm 0.2$	$230 \pm 25^a$	–	$181 \pm 16$	$901 \pm 25$	$46 \pm 12$	4
1159	$4.0 \pm 4.0$	$1.9 \pm 0.3$	–	–	$98 \pm 4$	$654 \pm 7$	–	4
Double 1 + 345	$-6.8 \pm 4.2$	$3.0 \pm 0.5$	$298 \pm 89$	$142 \pm 26$	$42 \pm 3^a$	$202 \pm 14^a$	$14 \pm 1^a$	4
Double 1 + 905	$-3.7 \pm 5.9$	$2.9 \pm 0.2$	$154 \pm 31^a$	–	$59 \pm 3^a$	$411 \pm 85^a$	–	3
Double 1 + 1158	$0.3 \pm 3.9$	$2.3 \pm 1.5$	$279 \pm 48$	$145 \pm 26$	$57 \pm 6^a$	$318 \pm 82^a$	$21 \pm 4^a$	4–9
Double 345 + 905	$-13.5 \pm 5$	$3.4 \pm 0.3$	$270 \pm 110$	$101 \pm 17$	$152 \pm 10$	$811 \pm 82^a$	$39 \pm 2^a$	4
Double 345 + 1158	$-6.7 \pm 2.7$	$2.5 \pm 0.1$	$331 \pm 37$	–	$132 \pm 7$	$705 \pm 17^a$	–	4
Co-transfected 1 and 1158	$-15.5 \pm 2.0^{a,b}$	$2.9 \pm 0.4$	$125 \pm 18^{a,b}$	$82 \pm 15^a$	$85 \pm 8^{a,b}$	$596 \pm 64^{a,b}$	$29 \pm 3^{a,b}$	4–6

<sup>a</sup>  $P<0.05$  versus Wild-type.

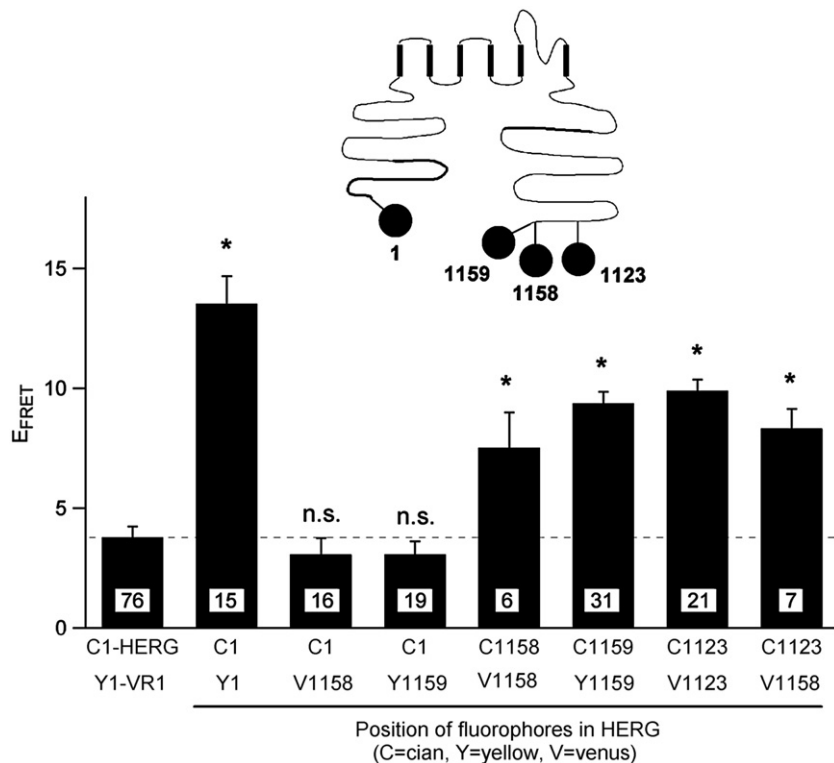
<sup>b</sup>  $P<0.05$  versus 1- and 1158-labeled channels.



**Fig. 3.** Verification of FRET signals specificity between assembled tetramer subunits of amino terminus-labeled HERG channels. (A) Comparison of whole-cell (top a) FRET levels and those determined separately either in a defined region over the plasma membrane (bottom a) or in the rest of the cell body. Calibration bar: 10  $\mu$ m. The fluorometric determinations were performed on regions of interest as indicated in a, defined over the whole-cell area of the transfected CHO cells (b,c left), the outer border mostly representing the plasma membrane (b,c middle) or only the cell center excluding the outer border (b,c right) of the same cells. The donor fluorescence recovery during selective photobleaching of the acceptor was determined as described in Fig. 2B. Quantitative  $E_{\text{FRET}}$  levels obtained as indicated in Methods for the indicated areas are compared in panel c. (B) Comparison of FRET levels in the whole-cell and in membrane patches excised from cells expressing the same HERG protein construct. a, microphotographs of the imaged cells and excised membrane patches under epifluorescence (left) or bright-field (right) illumination. Calibration bar: 10  $\mu$ m. The white circle indicates the area from which fluorescence recordings were obtained upon patch excision. b, time-course of donor and acceptor fluorescence variation in excised patches submitted to acceptor photobleaching. Averaged  $E_{\text{FRET}}$  levels from four independent measurements are indicated. c, comparison of  $E_{\text{FRET}}$  in excised patches and whole-cell recordings from cells expressing the same fusion construct. (C) Independence of  $E_{\text{FRET}}$  on fluorescent protein expression levels. Single cell data plotted against the expression level of YFP-HERG are shown. The results of a linear regression to the data are overlaid. (D) Comparison of FRET levels between the N-terminally-labeled CFP-HERG/YFP-HERG pair and YFP-HERG co-expressed with VR1 labeled with CFP in the amino terminus. Linear regression analysis of donor recovery vs. fractional acceptor photobleach for the CFP-HERG/YFP-HERG and CFP-VR1/YFP-HERG pairs is shown in the central panel. The donor fluorescence recovery during selective photobleaching of the acceptor for the pair CFP-VR1/YFP-HERG is shown in the inset. n.s.: not significant vs. whole-cell.

(see above) or after residues 1123 or 1158 (not shown). However, only a basal FRET signal was observed following co-expression of N-terminally CFP-labeled channels with those carrying V/YFP fluorophores at positions 1158 or 1159 ( $E_{\text{FRET}}$   $3.07 \pm 0.68$ ,  $n=16$  and  $3.06 \pm 0.5$ ,  $n=19$ ; Fig. 4). These data further support the specificity of the FRET detected between the amino terminals. Interestingly, FRET signals significantly elevated above the control HERG/VR1 pair were obtained when C-terminally V/YFP-labeled HERG (with the fluorophore at residues 1158

or 1159) were co-expressed with subunits labeled with CFP in the same positions [ $E_{\text{FRET}}$   $7.52 \pm 1.48$  ( $n=6$ ) and  $9.37 \pm 0.48$  ( $n=31$ ), respectively; Fig. 4]. Similar FRET efficiencies were measured in cells co-expressing fluorescent channels with CFP and VFP both at positions 1123 ( $9.9 \pm 0.47$ ,  $n=21$ ) and when channel subunits labeled at residue 1123 were co-expressed with those labeled at residue 1158 ( $8.32 \pm 0.82$ ,  $n=7$ ). These results and the functional integrity of the fluorescent constructs suggest that failure to detect significant FRET signals between channel subunits



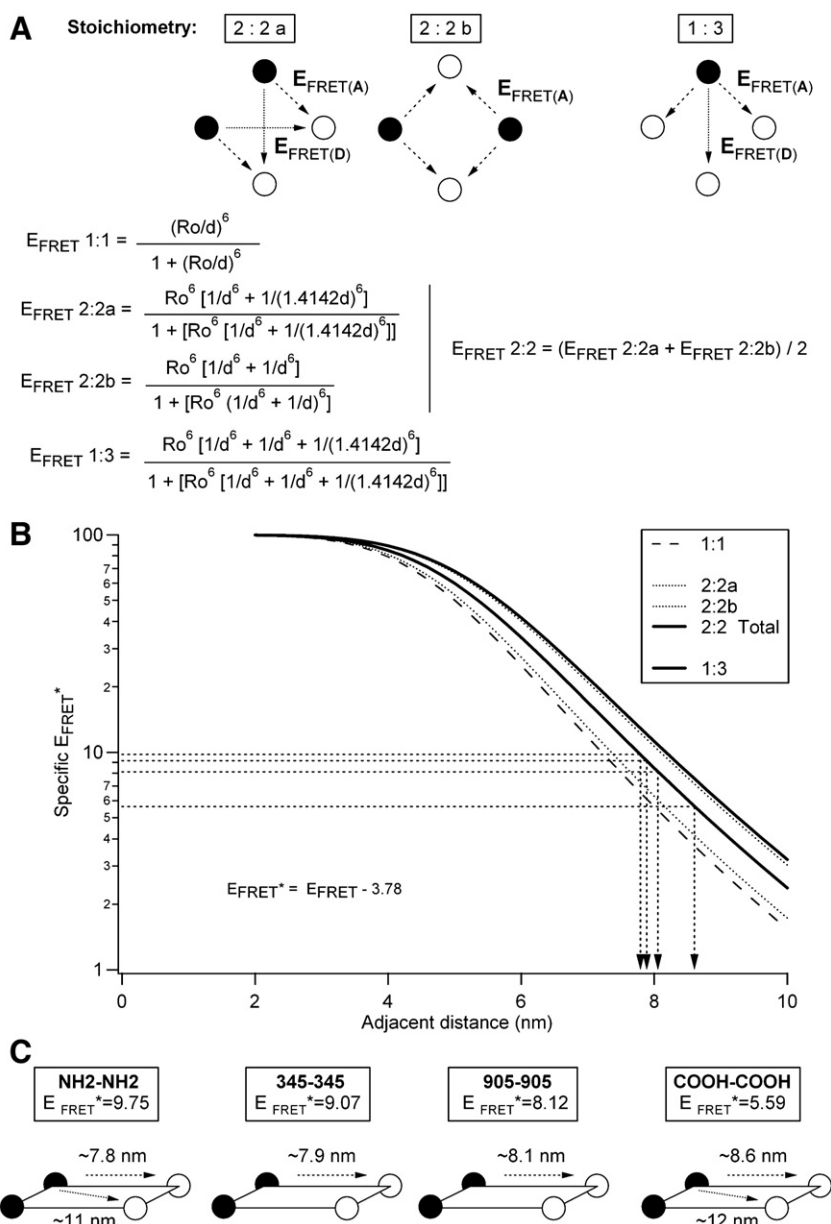
**Fig. 4.** FRET efficiencies between HERG subunits labeled in the amino and carboxy termini. Different combinations of HERG channels labeled with CFP or Y/VFP at residues indicated on the abscissa were co-expressed in CHO cells and FRET efficiencies were quantified as described in Methods. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM of 2–5 co-transfection experiments for the indicated number of cells. FRET levels following co-expression of the putatively non-interacting VR1 and HERG proteins are shown for comparison. Combinations showing a significantly increased ( $P < 0.05$ ) FRET signal as compared with the VR1/HERG pair are marked with an asterisk. N.s.: not significant vs. VR1/HERG. A schematic representation of a HERG channel subunit topology showing the position of the fluorescent labels (black circles) is shown in the inset. Transmembrane helices S1–S6, the position of the pore region between S5 and S6 and the situation of the EAG and CNBD domains in the amino- and carboxy-terminals, respectively, are highlighted. No significant differences are present between the  $E_{\text{FRET}}$  values of 1158/1158, 1159/1159, 1123/1123 and 1123/1158 pairs.

labeled at residues 1 and 1158 or 1159 is not due to the inability of C-terminally labeled subunits to assemble properly as a result of disruption of a putative tetramerization domain located in the carboxy terminus. It can be argued that even though C-terminally labeled homotetrameric channels are readily assembled, the low FRET levels observed in cells co-expressing N- and C-terminally labeled subunits are due to lack of heterotetrameric assemblies. Two lines of evidence indicate that heteromers are indeed formed in these cells. First, robust HERG-like currents with electrophysiological characteristics unlike those observed in cells expressing channels only labeled in the amino or the carboxy termini are observed in the co-transfected cells. As shown in Table 2, the activation voltage dependence and kinetics of these currents do not correspond to those expected from a simple mixture of amino- and carboxy-labeled channels, strongly arguing in favor of the presence of additional subunit combinations. Second, properly assembled functional channels are obtained with double-labeled constructs carrying fluorophores attached to both the amino and the carboxy termini, demonstrating that up to eight fluorescent proteins can be introduced in these positions without impairing channel function (see below). Interestingly, the lower  $E_{\text{FRET}}$  values in cells expressing carboxy-labeled constructs as compared to those obtained upon expression of subunits labeled in the amino terminus, also indicate that although the C-terminal labels of the channel subunits are separated by a distance yielding a detectable FRET signal, such a distance is likely higher than that between the amino termini labels. Moreover, the detection of similar FRET values with the 1123/1123, 1158/1158, 1159/1159 and 1123/1158 pairs suggests that the smaller FRET signals between C-terminally labeled subunits are not only due to variations in the relative orientation of the fluorophores, but they reflect increased distances between the carboxy termini of the subunits

in the channel tetramer as compared with those separating the amino terminal ends.

### 3.3. Estimations of intramolecular distances between fluorophores introduced in the amino and carboxy ends

In a tetrameric structure, both adjacent and diagonal distances between the fluorophores will contribute to the distance estimated from FRET measurements. As indicated in the Methods section, almost exclusively 2:2 and/or 1:3 CFP:YFP-labeled subunit stoichiometries are expected to produce FRET under our experimental conditions. As schematically illustrated in Fig. 5A, in a 2:2 stoichiometry two equivalent arrangements of donor and acceptor labels are produced in which a given donor is surrounded by an adjacent- and a diagonally-located (2:2a combination) or two adjacent (2:2b) acceptors. In a 1:3 stoichiometry the energy transfer of the donor will be directed towards two adjacent and a diagonal acceptor. Assuming a  $R_0$  value of about 5 nm see (Methods) and since the same residues in the different subunits of the tetramer must be located in an  $x$ - $y$  plane parallel to the cell membrane maintaining a symmetrical structure with respect to the central axis of the channel, the calculation of FRET efficiencies as a function of the interfluorophore distances for adjacent CFP/YFP pairs arranged in a 2:2 or 1:3 tetrameric structure yields the curves shown in Fig. 5B. Considering our FRET measurements once the non-specific FRET (3.76 of the HERG/VR1 pair) is subtracted and using the 2:2 arrangement as a standard, the specific  $E_{\text{FRET}}$  value obtained with the co-expressed CFP/YFP amino terminal constructs ( $9.75 \pm 1.61$ ) would mean a separation of  $7.76 \pm 0.24$  nm between the labels in adjacent subunits (with a  $\approx 11$  nm diagonal separation), when the fluorophores are located in the amino termini of the four HERG channel subunits

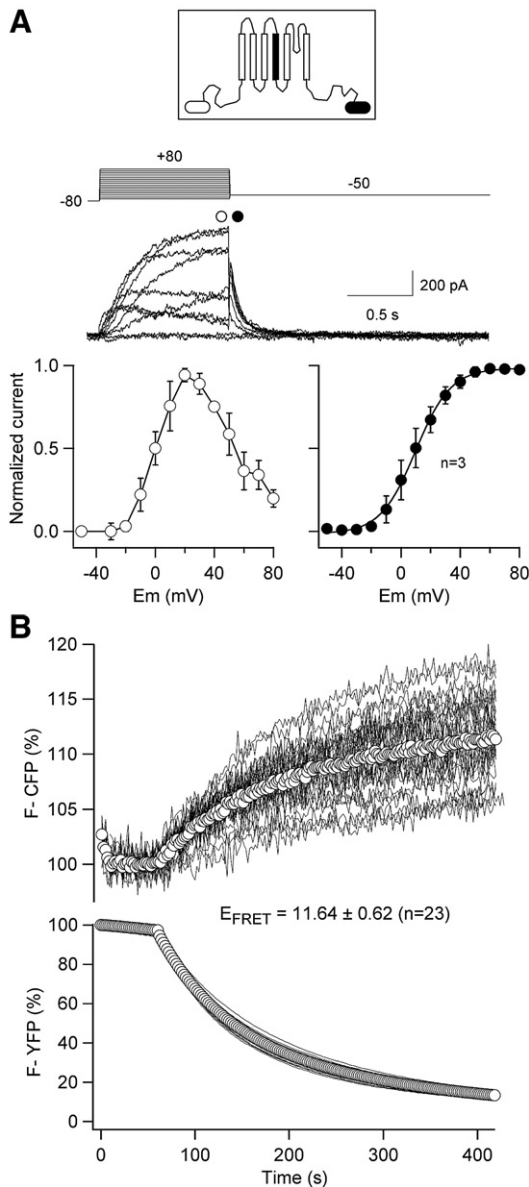


**Fig. 5.** Determination of intramolecular distances between labels introduced in identical positions of the four subunits assembled in a HERG channel tetramer. (A) Diagrammatic representations of possible energy transfer pathways for labeled subunit tetramers in a fourfold symmetrical arrangement and 2:2 or 1:3 stoichiometry. Mathematical expressions for  $E_{\text{FRET}}$  calculation as a function of the distance “ $d$ ” between adjacent fluorophores for a single pair (1:1) and 2:2 or 1:3 stoichiometries are shown. The product of  $d$  times square root of 2 (1.4142 $d$ ) corresponds to the diagonal distance according to the Pythagorean theorem. Donor and acceptor fluorophores are represented by solid and open circles, respectively. (B) Dependence of  $E_{\text{FRET}}$  on adjacent distance between fluorophores in individual tetramer subunits. Calibration curves were obtained using the expressions indicated in A and correspond to a 1:1 single pair (dashed line), 2:2a and 2:2b combinations (lower and upper dotted lines, respectively), the averaged  $E_{\text{FRET}}$  in the 2:2 stoichiometry (lower solid line) and the  $E_{\text{FRET}}$  in the 1:3 arrangement (upper solid line). Extrapolated distance values for  $E_{\text{FRET}}$  obtained with HERG channels labeled in the amino terminal end or following residues 345, 905 or 1159, are signalled with arrows. Net or specific  $E_{\text{FRET}}$  values after subtraction of unspecific FRET obtained with the VR1/HERG pair were used. For more explanations see text. (C) Schematic representations of interfluorophore distances corresponding to specific  $E_{\text{FRET}}$  values obtained from expressed HERG channels labeled with the fluorophores as indicated.

(Fig. 5C). Performance of an equivalent analysis using the FRET value for C-terminal labeled channel subunits (specific  $E_{\text{FRET}}$  5.59±0.93) suggests that the carboxy terminal labels would be placed at a distance of 8.58±0.26 nm between adjacent subunits (corresponding to ≈ 12 nm of diagonal separation).

The localization of the four amino and carboxy end labels in two square planes of ≈7.8 and ≈8.6 nm lateral sizes and the absence of specific FRET between pairs of constructs labeled in the amino and the carboxy termini, excludes the possibility that the N-termini are coplanar with the carboxy ends. This lack of FRET signals could be considered as an indication that a considerable distance exists between the planes limited by the amino- and the carboxy-located fluorophores.

However, since in this case the donor and acceptor labels are in different subunits and they can be located at different distances from the membrane ( $z$ ), the number of possible pathways for energy transference is increased due to positioning of the labels in two planes for which torsion angles are unknown. Due to the high sensitivity of FRET to distance, it could be possible that even though a relatively short vertical distance between both planes could exist, only a negligible  $E_{\text{FRET}}$  is observed due to the diagonal separation between fluorophores in different subunits. To solve this uncertainty, we generated a double-labeled HERG construct carrying the donor and acceptor fluorophores in the amino and carboxy ends of the same subunit. Since this construct has an inherent 1:1 CFP:YFP stoichiometry, it was also used to calibrate



**Fig. 6.** Functional expression and determination of FRET level of the construct double-labeled in the amino and carboxy terminal ends. (A) Functional expression of double-labeled HERG channel subunits. A schematic representation of the construct indicating the location of the yellow and cyan labels in residues 1 and 1158 is shown in the inset. Representative ionic currents from transiently transfected CHO cells in response to the indicated voltage protocol are shown. Averaged fractional activation curves normalized to maximum for currents at the end of the depolarization step (open circles) or obtained by standard tail current analysis (closed circles) in the same cells are shown at the bottom. (B) Determination of donor fluorescence recovery during photobleaching of the acceptor. Relative increases in CFP fluorescence over initial levels and the remaining fluorescence intensity of YFP were obtained from transiently transfected CHO cells as detailed in the legend of Fig. 2. The symbols represent the calculated mean $\pm$ SEM, whereas the thin lines correspond to single cell traces. The averaged value of  $E_{\text{FRET}}$  is indicated on the graph.

the difference in fluorescence intensity of CFP versus YFP in our optical system, by measuring the FYFP/FCFP ratio of the transfected cells. Thus, we verified that the YFP fluorescence appeared  $10.1 \pm 0.6$  fold brighter than that of CFP ( $n=32$ ). Unexpectedly, robust HERG-type currents were systematically observed in patch-clamped cells transfected with the CFP/YFP double-labeled channel. These currents showed the typical rectification properties of HERG at positive voltages and a voltage dependence slightly shifted to more depolarized values (Fig. 6A and Table 2). As expected from the presence of an EAG/PAS function blocker particle in the amino terminus (see above), they also exhibited

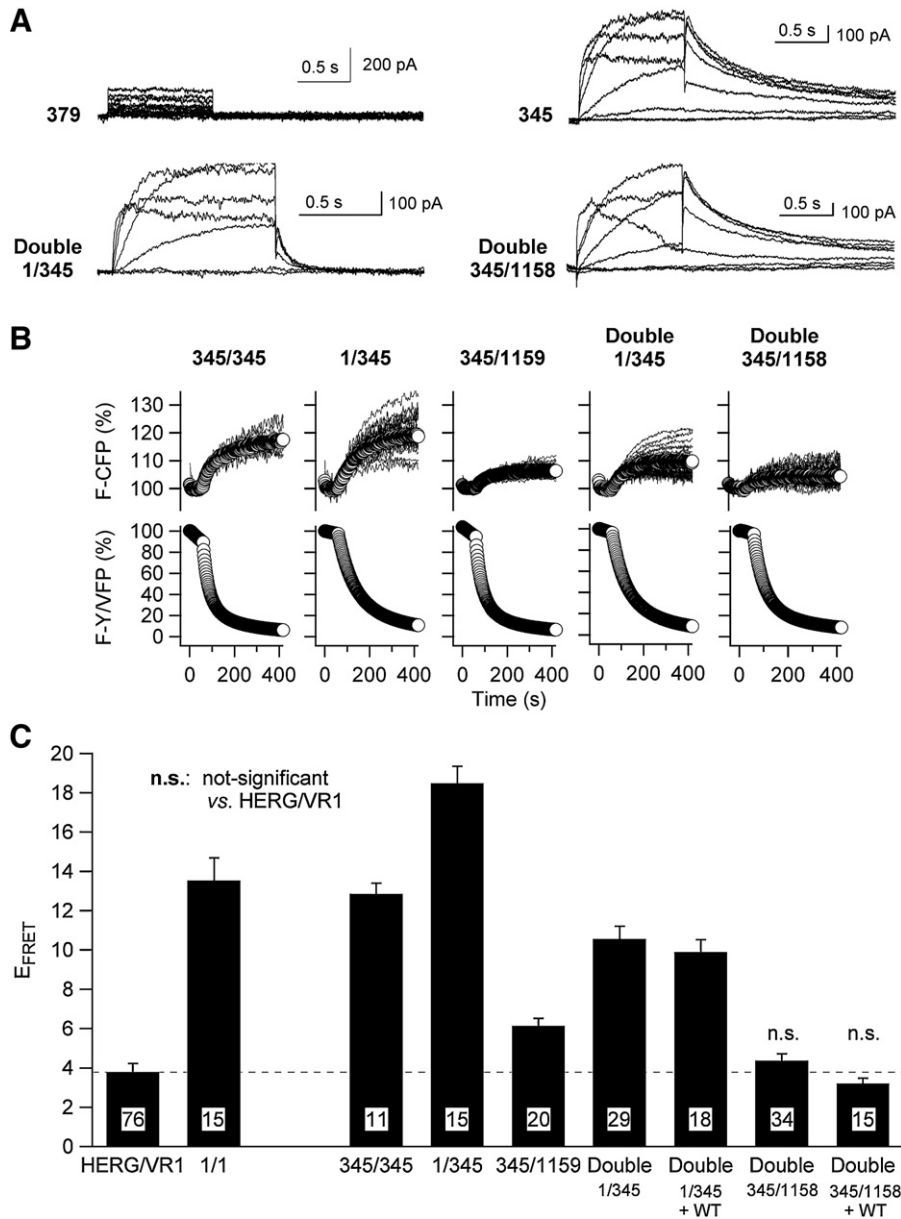
a faster deactivation time course than the unlabeled channels. This demonstrates that the tetrameric channel with eight fluorescent proteins attached at the ends of the subunits is still able to correctly assemble in the membrane and recapitulate the function of conventional HERG channels.

Performance of FRET measurements with the double-labeled channels yielded a significant amount of FRET ( $E_{\text{FRET}} 11.64 \pm 0.62$ ,  $n=23$ ; Fig. 6B) between the amino and carboxy terminal labels. To interpret these data in terms of intramolecular distances, we considered the two extreme situations in which the square planes delimited by the amino and carboxy terminal labels are arranged with no angular torsion or with a maximal  $45^\circ$  rotation between them (Supplemental Fig. 1A). Subsequently, calibration curves for FRET efficiencies as a function of the vertical distance between both planes were generated, considering all possible triangulations between points at the vertices of the squares (Supplemental Fig. 1B). Extrapolation of the net  $E_{\text{FRET}}$  ( $7.86 \pm 1.07$ ) obtained with the double-labeled construct to these calibration curves, yielded a vertical distance between the planes delimited by the amino and carboxy terminal labels ranging from 7.30 to 7.79 nm.

Knowing the vertical separation between the amino and carboxy end labels, we turned back to our FRET data with co-expressed CFP and YFP individual constructs, and considered all possible combinations for arranging them in the 2:2 or 1:3 stoichiometries expected to produce FRET under our experimental conditions and under the two extreme situations: no angular torsion or maximal  $45^\circ$  rotation between planes (Supplemental Fig. 2). Next, calibration curves corresponding to these arrangements were generated relating FRET efficiencies and vertical distance between planes. As shown in Supplemental Fig. 3, calculations of expected FRET efficiencies as a function of vertical distances following all possible triangulations indicated that, for a vertical separation between planes of 7.30 to 7.79 nm, the only arrangement for which no significant FRET is expected (as observed after co-expression of amino terminus CFP-labeled subunits with V/YFP-labeled channels at positions 1158 or 1159; see above), corresponds to a combination with the unlabeled carboxy terminus of a given subunit directly below the labeled amino of the same subunit and with no remarkable angular torsion between planes.

#### 3.4. FRET measurements and estimations of intramolecular distances with HERG channels labeled at residues 345 and 905

Whereas FRET can give a measure of the proximity of fluorescent molecules, FRET efficiencies can be affected by other variables leading to misinterpretation of the data in terms of intramolecular distances (see below). To avoid this possibility, we tried to obtain further conviction from the availability of multiple labeled constructs, performing additional triangulations with new reference points that could help us to validate our distance estimations. Our initial goal of using constructs with fluorophores located close to the transmembrane helices to gain some insight on the position of the amino and the carboxy termini with respect to the central channel core, were hampered by the fact that none of the fusion proteins tested with insertions between residues 345 and 905 yielded functional HERG channels (Table 1). Thus, we chose to use channels labeled at these two positions for further work. To perform an analysis similar to that described for the amino and carboxy ends, we generated two additional constructs in which the CFP and VFP labels introduced by transposition after residues 345 and 905 were changed to VFP and CFP, respectively see (Methods). Four double-labeled proteins carrying donor and acceptor fluorophores in the same subunit were also constructed with CFP and VFP at residues 1 and 345, 345 and 1158, 1 and 905, or at residues 905 and 1158. In this case, an FVFP/FCFP ratio of  $13.1 \pm 0.7$  ( $n=78$ ) was observed in cells expressing these double-labeled constructs, indicating a thirteen-fold increased brightness of VFP versus CFP for a 1:1 molar ratio in our optical set-up.

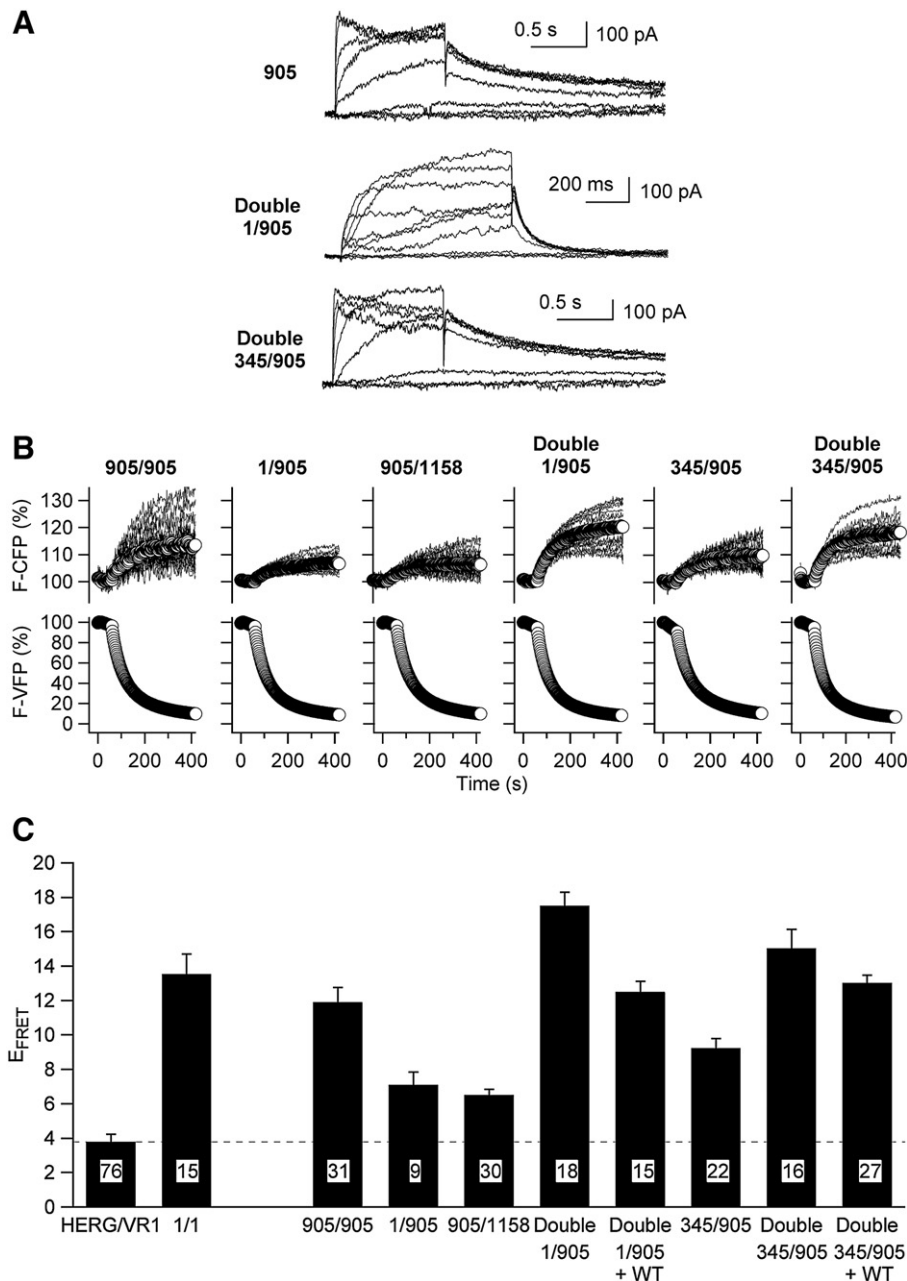


**Fig. 7.** Functional expression and FRET measurements with HERG channels labeled at residue 345 and in different combinations. (A) Representative ionic currents from transiently transfected cells expressing HERG channels labeled with GFP variants at residues 379, 345 or either both 1 and 345 (Double 1/345) or 345 and 1158 (Double 345/1158). 1 s depolarization pulses up to +60 mV in 20 mV increments from a holding voltage of -80 mV were delivered to the cells, followed by a 2 s repolarization period at -50 mV. Note the complete absence of HERG-like currents using the 379-labeled construct and the expanded time scale and the fast deactivating tail currents for the double 1/345 construct. (B) Determination of donor fluorescence recovery during acceptor photobleaching in cells either co-expressing HERG channels carrying CFP and YFP at residues 345/345, 1/345 and 345/1159, or transfected with double-labeled subunits with donor and acceptor fluorophores at residues 1 and 345 or 345 and 1158. Relative increases in CFP fluorescence over initial levels and the remaining fluorescence intensity of YFP were obtained from transiently transfected CHO cells as detailed in the legend of Fig. 2. The symbols represent the calculated mean  $\pm$  SEM, whereas the thin lines correspond to single cell traces. (C) Comparison of E<sub>FRET</sub> for channels labeled as indicated in panel B. FRET levels from the HERG/VR1 pair and from co-expressed channels labeled with CFP and YFP in the amino end are also shown for comparison. Bars represent the mean  $\pm$  SEM of 2–5 transfections for the indicated number of cells. Data corresponding to co-transfections with 4  $\mu$ g DNA of the double-labeled constructs plus 4  $\mu$ g of the plasmid containing wild-type HERG are also shown.

Patch-clamp analysis of all these constructs indicated that they are able to form functional channels in the plasma membrane, as demonstrated by the presence of HERG-like currents in transfected HEK293 and/or CHO cells (Figs. 7A and 8A). Interestingly, whereas slow deactivating currents with similar kinetics as those of unlabeled HERG were observed in cells expressing 345, 905 and double-labeled 345/1158 constructs, very fast decaying tail currents at -50 mV were observed in cells transfected with double-labeled 1/345 and 1/905 channels (see also Table 2). Again, this indicates that whereas blockade of EAG/PAS domain functionality by introducing the protein fluorophore in the amino terminus does not impair the ability of the fusion proteins to assemble, tetramerize and be functionally expressed in the

plasma membrane, it effectively constrains the ability of this domain to slow down HERG channel closing.

The results of FRET measurements using channel subunits labeled at position 345 combined with those labeled in the amino and carboxy termini in several combinations are summarized in Fig. 7B,C. It can be observed that a substantial amount of specific FRET is exhibited by cells co-expressing HERG subunits labeled with CFP and YFP both at positions 345 ( $12.85 \pm 0.55$ ,  $n=11$ ) or 1 and 345 ( $18.48 \pm 0.87$ ,  $n=15$ ) and also in cells expressing the double labeled 1/345 construct ( $10.55 \pm 0.66$ ,  $n=29$ ). However, only a basal FRET efficiency is obtained in cells carrying double-labeled 345/1158 channels ( $4.36 \pm 0.35$ ,  $n=34$ ; not significant versus HERG/VR1 expressing cells). A small but significant E<sub>FRET</sub> was



**Fig. 8.** Functional expression and FRET measurements with HERG channels labeled at residue 905 and in different combinations. (A) Representative ionic currents from cells co-expressing HERG channels labeled with CFP and VFP at residue 905 (top) or transfected with double labeled subunits carrying fluorophores both at residues 1 and 905 (Double 1/905) or 345 and 905 (Double 345/905). 1 s depolarization pulses up to +60 mV in 20 mV increments from a holding voltage of -80 mV were delivered to the cells, followed by a 2 s repolarization period at -50 mV. Note the expanded time scale and the fast deactivating tail currents obtained with the double labeled 1/905 construct. (B) Determination of donor fluorescence recovery during acceptor photobleaching in cells either co-expressing HERG channels carrying CFP and VFP at residues 905/905, 1/905, 905/1158 and 345/905, or in cells transfected with subunits double-labeled at residues 1 and 905 or 345 and 905. Relative increases in CFP fluorescence over initial levels and the remaining fluorescence intensity of YFP were obtained from transiently transfected CHO cells as detailed in the legend of Fig. 2. The symbols represent the calculated mean  $\pm$  SEM, whereas the thin lines correspond to single cell traces. (C) Comparison of  $E_{\text{FRET}}$  for channels labeled as indicated in panel B. Bars represent the mean  $\pm$  SEM of 2–5 transfections for the indicated number of cells. FRET levels from the non-interacting HERG/VR1 pair and from co-expressed channels labeled with CFP and YFP in the amino end are also shown for comparison. Data corresponding to co-transfections with 4  $\mu$ g DNA of the double labeled constructs plus 4  $\mu$ g of the plasmid containing wild-type HERG are also shown.

present in cells co-transfected with constructs labeled at residues 345 and 1159 ( $6.14 \pm 0.38$ ,  $n=20$ ;  $P < 0.05$  vs. HERG/VR1).

It is important to note that  $E_{\text{FRET}}$  remained almost the same when 4  $\mu$ g of plasmid DNA coding for unlabeled HERG plus 4  $\mu$ g of DNA containing the double-labeled 1/345 construct was used for transfection (Fig. 7C). These total amounts and proportions of plasmid DNA were chosen to maintain as much as possible the viability of the transfected cells and also enough of a fluorescence level of the double-labeled protein to perform the FRET measurements. Similar results were obtained when unlabeled wild-type HERG was co-expressed

with double-labeled constructs 345/1158, 1/905 and 345/905 (Figs. 7C and 8C) or 1/1158 ( $E_{\text{FRET}} 8.6 \pm 0.42$ ,  $n=20$ ). In all cases, only moderate reductions in  $E_{\text{FRET}}$  ranging from 7% with the double 1/345 to 27% with the double 345/1158 constructs were observed. As expected, the relatively small effect caused by introduction of an excess of unlabeled HERG is not due to reduced expression of this protein, as shown by the appearance of slowly deactivating HERG currents in cells co-expressing the fast deactivating 1/1158, 1/345 or 1/905 double-labeled channels and wild-type HERG (not shown). These results add further support to the interpretation that the FRET signals are mainly due to

specific assembled proteins and not to random collisions of over-expressed molecules. It should also be noted that depending on the stoichiometry and torsion of the channel oligomers, some  $E_{\text{FRET}}$  reductions are possible even with specifically assembled tetramers in which unlabeled subunits are combined with double-labeled ones. Thus, as illustrated by the possible transference pathways shown in [Supplemental Fig. 1A](#), lower efficiencies will be obtained if only a single donor and acceptor pair carried by a given subunit is included in the tetrameric channel schemes, eliminating the additional energy transferences to unlabeled adjacent partners. It might also be possible that some subtle modification of the relative orientation of both fluorophores takes place in the otherwise specifically assembled molecules, when part of the eight fluorophore tetramers produced by expressing the double labeled constructs alone are changed to lower order fluorescent oligomers by introduction of non-fluorescent subunits, leading to some variation in the observed FRET levels.

Equivalent data to those corresponding to 345-labeled channels, but obtained with different combinations of channel subunits labeled at residue 905 and other positions, are shown in [Fig. 8B,C](#). In these cases, cells co-expressing donor- and acceptor-labeled subunits at position 905 yielded an  $E_{\text{FRET}}$  value of  $11.9 \pm 0.85$  ( $n=31$ ). The FRET efficiency was even higher upon expression of the double-labeled constructs 1/905 ( $17.5 \pm 0.8$ ,  $n=18$ ) and 345/905 ( $15.03 \pm 1.1$ ,  $n=16$ ). On the other hand, a considerably smaller  $E_{\text{FRET}}$  was recorded in cells co-expressing HERG subunits labeled with CFP and VFP at positions 1 and 905 ( $7.0 \pm 0.75$ ,  $n=9$ ) or at positions 905 and 1158 ( $6.51 \pm 0.33$ ,  $n=30$ ). Finally, a FRET efficiency of  $9.23 \pm 0.57$  ( $n=22$ ) was obtained upon co-expression of 345- and 905-labeled HERG channel subunits.

Interpretation of these FRET efficiencies as previously detailed for the case of the amino and carboxy end pairs indicates that, for the  $9.07 \pm 1.0$  net  $E_{\text{FRET}}$  obtained after co-expressing CFP and VFP pairs labeled at residue 345, the square  $x$ - $y$  plane corresponding to the labels at position 345 of the tetrameric structure would have a side size of  $7.87 \pm 0.16$  nm ([Fig. 5B,C](#)). According to this value and given the  $\approx 8.6$  nm lateral size of the plane delimited by the carboxy end labels, the negligible specific FRET obtained with the double labeled 345/1158 channel means that the vertical separation between the 345 and the 1158 label planes is at least 9–10 nm regardless of the angular torsion established between them (see [Supplementary Fig. 1](#) for a detailed description of the procedures analogously used to find the corresponding vertical distance with 1/1158 double labeled channels). Since these data indicate a slightly longer vertical distance separating the 345 and COOH label planes than the  $\text{NH}_2$  and COOH, the 345-located fluorophores are slightly above those introduced at the amino termini. Application of an equivalent analysis to the double-labeled 1/345 data predicts a vertical separation of between 7.7 (with  $45^\circ$  torsion) and 8.1 nm (without torsion) for the planes corresponding to the 1 and 345 labels (but see below).

Knowing the lateral size of the  $\text{NH}_2$ , COOH and 345 planes and the vertical separation between them, it should be possible to use the data obtained by co-expressing pairs of subunits labeled at those positions to further define their relative arrangement and, more importantly, to validate the previously calculated distances. The results of this analysis are presented in [Supplemental Fig. 4A,B](#). It can be observed that for a vertical distance of 9–10 nm separating the 345 and 1159 fluorophore planes, a FRET efficiency of around 2 would be expected, providing that a sizeable torsion is present (see [Supplemental Fig. 4B](#)). This nicely fits with the  $2.36 \pm 0.83$  value of net  $E_{\text{FRET}}$  exhibited by cells co-expressing 345- and 1159-labeled subunits ([Fig. 7C](#)), but not with the total absence of FRET expected for channels in which the vertices of the 345 and 1159 label planes are perpendicular without any angular torsion.

Interestingly, since the planes delimited by the amino and carboxy end-located labels do not show any sizeable torsion between them (see above), an angular rotation similar to that encountered between the labels in the 345 and 1159 positions should also exist between the 1-

and 345-located labels. This is confirmed by the FRET level obtained with the 1 and 345 pair co-expressing cells. The  $14.7 \pm 1.32$  specific  $E_{\text{FRET}}$  obtained in this case ([Fig. 7C](#)), the highest value of all the tested combinations, is not consistent with the  $E_{\text{FRET}}$  value below 10 expected for any vertical distance separating the 1 and 345 label planes if no angular torsion exists between them. Note also that if this torsion does not occur, such distances would never be lower than 4–5 nm due to the dimensions of the GFP-based fluorophores. Therefore, only an effective range of FRET efficiencies of around 2 or less can be expected under these circumstances. Finally, even though the high  $E_{\text{FRET}}$  observed with the 1/345 pair seems to lie above that expected for the 7.7–8.1 nm vertical separation predicted by the double-labeled 1/345 data (see above), it is likely that this distance became increased in the double-labeled construct (but not so much in the co-transfected pair) by some steric collision between labels. It is also possible that in this case the physical proximity of both labels could force a more unfavorable orientation of both fluorophores, somehow contributing to reduce the observed FRET level.

The performance of an analogous analysis using the results obtained with different combinations of 905-labeled channels indicates that the  $8.12 \pm 1.3$  net  $E_{\text{FRET}}$  of cells co-expressing subunits labeled at residue 905 means an  $8.12 \pm 0.24$  nm side size for the quadratic plane corresponding to the labels at this position ([Fig. 5B,C](#)). The  $13.72 \pm 1.25$  net  $E_{\text{FRET}}$  obtained with the double-labeled 1/905 construct ([Fig. 8B,C](#)) predicts a vertical separation of 6.33 to 6.96 nm between the amino and 905 fluorophore planes, both for arrangements with no angular torsion or maximal  $45^\circ$  rotation, respectively. According to these distances, a FRET efficiency of between 5 and 19 would be expected for co-expressed 1- and 905-labeled channels if torsion is present, but only of around 3 with no angular torsion ([Supplemental Fig. 4C](#)). Therefore, the  $3.32 \pm 1.2$  net  $E_{\text{FRET}}$  obtained under these circumstances ([Fig. 8C](#)) suggests that no angular torsion exists between the planes defined by the amino terminus- and 905-located labels. This is further supported by the data from cells co-expressing 905- and 1158-labeled subunits. In this case, the  $2.73 \pm 0.78$  net  $E_{\text{FRET}}$  ([Fig. 8B,C](#)) would also be consistent with the  $E_{\text{FRET}}$  value below 5 expected for an almost vertical positioning of the 905 and 1158 labels, but very different from the  $E_{\text{FRET}}$  above 10 predicted with torsion between them ([Supplemental Fig. 4E](#)). Finally, a rotated 345 plane with respect to non-torsioned  $\text{NH}_2$ , 905 and COOH planes, predicts a 4–7  $E_{\text{FRET}}$  level after co-expression of 345- and 905-labeled subunits. This is indeed coherent with the  $5.45 \pm 1.02$  net  $E_{\text{FRET}}$  measured in these cells ([Fig. 8B,C](#)), a FRET level that would not be obtained if fluorophores at the 345 and 905 positions were vertical to each other, since in this situation almost no FRET would be expected ([Supplemental Fig. 4D](#)).

#### 4. Discussion

Here, we have generated a library of fluorescent HERG channel constructs carrying CFP and V/YFP in multiple positions of the HERG coding sequence, to study by FRET the relative arrangement of different regions in the protein. The labeled channels were functionally expressed in HEK293 and CHO cells. Remarkably, despite the insertion of a large fluorescent domain in the channel protein, many HERG fusion proteins are still fully functional. Essentially, we found that fusion of the fluorescent proteins to the cytoplasmic regions corresponding to the proximal domain in the amino terminus or the final segment of the carboxy terminus do not compromise channel function. However, apart from the construct carrying the label at the first amino acid of the protein, no functional channels were detected upon insertion of the reporter fluorophores in the initial portion of the amino terminus corresponding to the EAG/PAS domain, in the central channel core, or in the segment after the sixth transmembrane helix including the linker between S6 and the CNBD and the CNBD itself.

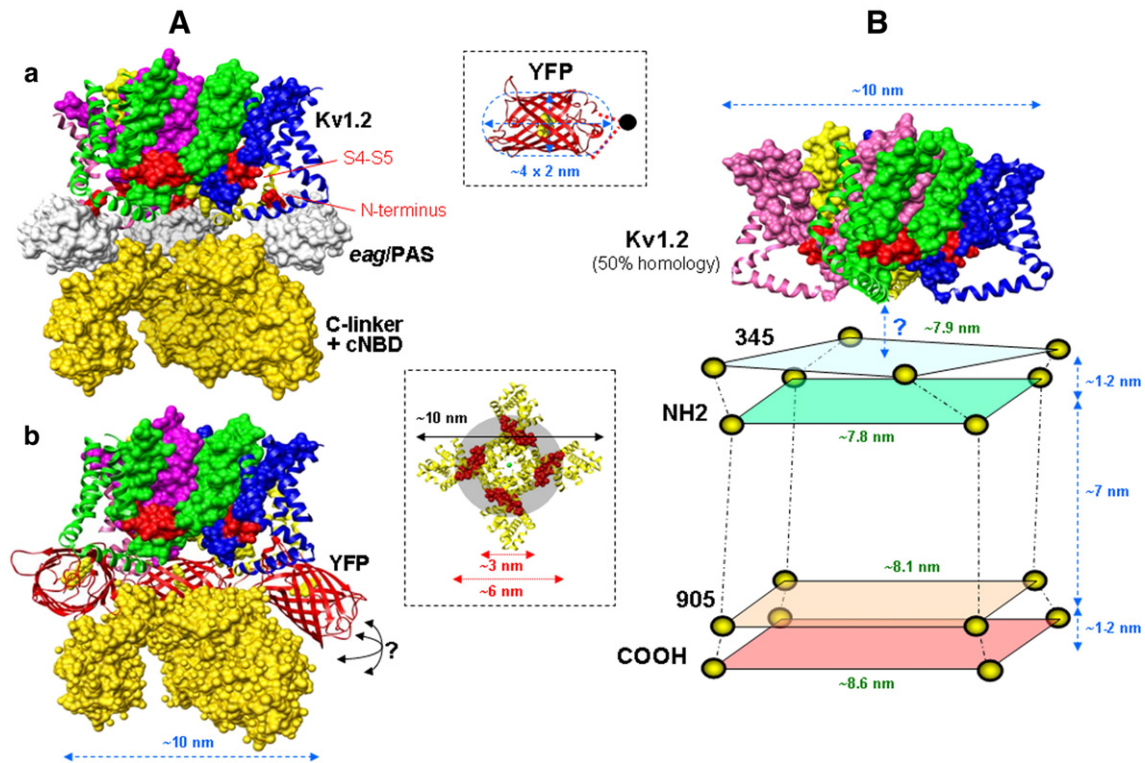
The localization of the permissive insertions only in specific areas of the sequence may provide some insights about the structural



arrangement and/or the functional implications of these regions in the context of the whole channel. Thus, it is likely that more deleterious effects are expected by insertion of the labels in an internally located domain when compared to insertions in a surface aqueous-exposed region. The lack of functionality of the C-linker- and CNBD-labeled constructs would be coherent with the localization of this region as a compact tetrameric structure in a central position immediately below the cytoplasmic pore opening as previously proposed for HCN and TRP channels [8,10]. Indeed, the participation of this region in the tetrameric assembly of HERG has been also proposed [11]. Similarly, a compact EAG/PAS domain would also be compatible with its ability to form tetramers *in vitro* in the absence of the rest of the protein, and to inhibit the functional expression of wild-type HERG [16]. However, this protein segment only forms monomers in crystal structures [18] and channels carrying N-terminal truncations that delete the EAG/PAS domain can form functional channels in the plasma membrane [18–22], even though reduced current densities are systematically obtained upon expression of constructs lacking either the EAG/PAS domain or most of the amino terminus (e.g.,  $\Delta 2$ –135 of  $\Delta 2$ –370 deletions; C. Alonso-Ron et al. unpublished). Interestingly, relatively long distances (corresponding to around 8–9 and 11–12 nm for adjacent and diagonal separations) between labels at equivalent positions of the four subunits, are suggested from our FRET-derived measurements using fully functional HERG channels. This suggests

that in our case the fluorescent labels may be mainly localized in peripheral positions, including those introduced in the amino end.

We propose therefore that the C-linker/CNBD region hangs centrally below the transmembrane core, in a similar fashion to that described for the same tetrameric region of HCN2 [10]. Unlike the central T1 domain position underneath the core of Kv channels [2–6], the amino terminus of HERG probably tracks to the periphery surrounding the C-linker/CNBD and extending to its bottom, where the proximal domain and the distal carboxy terminus might interact. As depicted in the homology model shown in Fig. 9A, it is likely that the EAG/PAS domain is establishing extensive contacts with the top and side surfaces of the C-linker/CNBD, helping to explain the functional interaction of the initial part of the N-terminus with the gating machinery, but also the disruptive effects of introducing voluminous labels in the EAG/PAS that could considerably perturb the central channel structures. Remarkably, the five positions in the EAG/PAS domain carrying a label (residues 43, 78, 87, 88 and 104) appear in quite different locations encircling the surface of the crystal EAG/PAS structure [18], making unlikely that all of them are directed towards a central space in the channel. However, all of them appeared non-functional. This opens the possibility that the EAG/PAS is still surrounded by other portions of the protein as recently proposed for the T1 domain of Kv2.1 [55]. Thus, further work would be necessary to check if the proximal domain and/or the carboxy terminus extend to



**Fig. 9.** Molecular arrangement of the fluorescent labels introduced in the HERG cytoplasmic domains and homology model of the channel. (A) Homology models of the HERG channel (a) and the amino terminus-labeled construct (b). The models were constructed using surface representations of the Kv1.2 pore region (PDB ID: 2A79), the C-linker/cNBD region from HCN2 (PDB ID: 1Q50) and the HERG EAG/PAS domain (PDB ID: 1BYW) or a ribbon representation of YFP (PDB ID: 1F0B) showing the position of the chromophore in the center of the molecule (yellow spheres). The different components are shown at the same scale. The Kv1.2 representation presents the four subunits of the tetramer differently coloured in green, blue, yellow and magenta. The position of the S4–S5 loop has been marked in red. Note that the fourth C-linker/cNBD, EAG/PAS and YFP structures located nearest the viewer have been removed for a better view of the assemblies. The rotation of these structures around the central vertical axis of the complex is arbitrary. The position of the EAG/PAS has been fixed to direct its amino terminal end (red spheres) towards the S4–S5 loop in the channel core. Both the EAG/PAS and the YFP structures have been docked against the channel complex preventing any superposition of the molecular volumes. Note also the good correspondence of the interfluorophore distances in the construct represented in panel b (carrying the YFP molecules in the position corresponding to the amino ends) and those calculated from FRET measurements. The unknown structures of the proximal domain and the remainder of the C terminus possibly located below the illustrated compositions, are not shown. (B) Relative position and approximated distances between fluorophores introduced in positions 1 (NH<sub>2</sub>), 345, 905 and 1159 (COOH) of HERG. The transmembrane core of Kv1.2 is shown at the top as a reference. A ribbon representation of YFP showing the approximate dimensions of the molecule at the same scale is shown in the upper inset. The positions of the amino and carboxy ends of the fluorescent protein and the approximate location of the insertion point in the host (black circle) are indicated. Lower inset. Ribbon diagram of Kv1.2 viewed from the cytoplasmic face with the S4–S5 in red. Molecular representations and combinations were generated using the UCSF Chimera from Computer Graphics Laboratory, University of California, San Francisco (supported by NIH P41 RR-01081).

the bottom of the channel either running parallel to the EAG/PAS or wrapping around it.

A question about the structural combinations shown in Fig. 9A is whether the volume of the EAG/PAS domain and the distances and volumes of the attached GFP variants could fit into the general dimensions of the model. In this respect it is worth noting that the separation between the channel core and the CNBD domains is probably longer than the arbitrarily set distance shown in Fig. 9A. Since the three-dimensional structure of the HERG channel transmembrane core is unknown, we used as a reference the atomic structure recently determined by X-ray crystallography for Kv1.2 [56], a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel showing a 26% identity and 43% similarity to HERG in the transmembrane helices and pore regions (data not shown). Thus, whereas in the Kv1.2 core structure the C-terminal end of the S6 helix lies closely associated to the internal surface of the plasma membrane due to its angular bending at the level of the PVP sequence, in HERG which lacks such a motif, the S6 should emerge from the transmembrane channel core in a more linear and tubular-like way. This topology has been recognized in the three-dimensional organization of other channels lacking the PVP signature such as KcsA [57] and in the recently determined crystal structure of the cyclic nucleotide-regulated channel MlotiK [58]. As previously suggested [8,59], it is likely that at least in some channel states the C-linker region following S6 also exists in an extended and more tubular-like tetrameric arrangement than the vertically collapsed crystal structure of the isolated HCN C-linker/CNBD depicted in Fig. 9A [10]. This would increase the separation between the membrane surface and the CNBD structures allowing for a better approximation of the EAG/PAS and/or the GFP variants to the central axis of the tetramer. Finally, assuming a peripheral localization of the GFP-derived fluorophores either longitudinally or transversely projecting from the channel structure (Fig. 9Ab), the ≈8 nm lateral size of the planes defined by the centre of the labels would localize their insertion points at a shorter distance (4–6 nm at both sides) from the central axis. For the labels introduced in the amino termini, that seem to interact with the S4–S5 loop, this distance would be consistent with the 3–6 nm range in which this loop is located relative to the central axis (lower inset of Fig. 9). Unfortunately, the use of non-functional HERG constructs to check a more compact localization of other labels towards the protein centre is hampered by the possibility of strong structural alterations in these constructs as a result of fluorophore insertion. Subsequently, we focused our efforts in those channel constructs exhibiting an intact functionality, indicative of no major distortions as a result of labeling.

There are two possible concerns regarding the utility of our FRET measurements to obtain information about the molecular organization of HERG. The first one relates to the specificity and quantification of the obtained signals and the second refers to the real meaning of the calculated interfluorophore distances. Due to the dependence of FRET from intra- and intermolecular distances between fluorophores, it could be expected that measuring the amount of energy transfer allows the determination of donor-acceptor distance [60–62]: the farther apart the fluorophores, the less energy transfer. However, it is also possible to obtain a considerable FRET signal in spite of a relatively long intramolecular distance due to unspecific random encounters produced by overexpression of labeled molecules. Conversely, a low FRET signal and/or a long estimated distance may be obtained even when a short interfluorophore separation exists if an inappropriate Förster distance ( $R_0$ , see below) is used or a complex (e.g., tetrameric) stoichiometry is present.

Regarding the first concern, our measurements of donor de-quenching upon acceptor photobleaching provide a simple and practical approach to unequivocally identify the existence of FRET signals, since such an increase in fluorescence would be achieved only if FRET is present. Conversion of the fluorescence intensities into molar ratios by normalizing the intensity ratios to those of a donor-acceptor tandem imaged at the same settings, and exclusion from the analysis

of those cells showing a low acceptor-to-donor ratio, ensured that only cells in which most of the donor is coupled to an acceptor were considered. This minimized the possible influence of unpaired donors ( $\alpha_D$  factor, see Methods) to measured  $E_{\text{FRET}}$  ensuring that the measured values closely approach the true FRET efficiency. Control of  $E_{\text{FRET}}$  independence from the fluorochrome expression levels over a wide range, the demonstration of equivalent FRET levels when measurements are done with the whole cell fluorescence or when they are restricted to plasma membrane regions in which properly assembled functional channels are located, and the systematic subtraction of signals coming from non-interacting molecules were used as an indication that our signals came from the specific assembly of ion channel subunits and not from random encounters or formation of bulk aggregates as a result of construct over-expression.

Performance of a quantitative analysis of FRET signals obtained with a pair of fluorophores provides a unique opportunity to discern the distance between donor and acceptor under physiological conditions and in a natural environment within the intact cell, using the Förster equation  $E_{\text{FRET}} = R_0^6 / (R_0^6 + d^6)$  [45,48,49,52,60,62], where  $d$  stands for the interfluorophore distance and  $R_0$  corresponds to the distance at which  $E_{\text{FRET}}$  is 0.5 (≈5 nm for the CFP/YFP pair assuming a random orientation distribution corresponding to a relative dipole orientation factor  $\kappa^2$  of 2/3; [48,51,52]). As indicated previously, our data with the 1/1123, 1/1158 and 1/1159 pairs and the equivalent  $E_{\text{FRET}}$  values between the 1123-, 1158- or 1159-located fluorophores of the four subunits suggest a quite random orientation of the labels. Previous analysis of the possible errors introduced by assuming  $\kappa^2 = 2/3$  also indicated that the uncertainty in distance introduced by the orientation factor is relatively small, usually less than 20% [43,60,61]. There is also evidence that covalently attached GFP variants are quite mobile under physiological conditions and anisotropy measurements indicate that they adopt random orientations [63,64]. Altogether, this indicates that within certain limits our FRET data can be interpreted in terms of distance, allowing a reasonable view of the global dimensions of HERG. It is important to emphasize that our measurements using different combinations of fluorescent labels located in different positions also provide an additional method to validate the measured distances. Thus, the final estimation of the distance between two given positions lies not only in the FRET data from channel constructs carrying the fluorophore partners in these positions, but also in the combination of measurements done with a number of labels in order to confirm that the calculated distances are coherent with those obtained with other pairs.

A limitation of inferring distances and/or structures from GFP-based fluorophores is that the GFP chromophores are located in the centre of a barrel-like entity ≈2.5 nm in diameter and ≈4 nm long (see inset of Fig. 9B). Apart from restricting the minimum distance detectable by FRET with a single CFP/YFP pair to the 5–10 nm range due to donor-acceptor steric collision, the calculated distances would correspond to those separating the CFP and V/YFP chromophores, not to those between the residues to which the labels are attached, limiting the spatial resolution of our measurements and the interpretation of FRET in terms of intramolecular distances. The interfluorophore distances estimated here have been incorporated into the models shown in Fig. 9 that are mostly consistent with our FRET measurements. Evidently the absolute coordinates shown cannot be considered as indicative of the real distances separating the protein residues, but they can contribute to better define the relative position of some channel domains. Our data indicate that the amino and carboxy end-located fluorescent labels and those introduced at position 905 of the four channel subunits delimit three parallel square planes without sizeable torsion between them, placing the centre of the labels introduced after residues 905 and 1158/1159 almost vertically aligned with those attached to the amino terminal end. This contrasts with the near 45° rotation of the

fluorophores inserted after position 345. Due to the short vertical separation predicted between the planes delimited by the 1 and 345 labels, it could be argued that the proposed rotation of the 345-located labels is not related to a non-vertical arrangement of the corresponding positions in the protein structure, but forced by competing packing problems due to the big size of the tags. However, our data also predict a similar torsion between the 345- and the 905- or 1158-located labels that are separated from the 345 fluorophores by a long distance. Note that if the 345-attached label rotation is simply due to an angular trajectory of the 345-attached label that rotates it (clockwise or counter clockwise), or if it is the result of a structural torsion of the channel protein that places the 345 position near the amino end of a non-adjacent subunit remains to be established.

Our data also indicate that whereas a vertical distance of around 8–9 nm exists between the planes limited by the amino and carboxy end labels, only around 1–2 nm separate the 345 and 905 planes from the amino and the carboxy terminal ends, respectively. Interestingly, the accuracy of these values is basically confirmed by the coincidence of distances reported by the 345/NH<sub>2</sub>, 345/905, 345/COOH, 905/NH<sub>2</sub> and 905/COOH pairs.

Even though our analysis only includes the four positions for which the measured distances were unequivocally assessed and validated by “multiple molecular triangulation”, it can yield some valuable information about the overall channel arrangement. In fact, an upside-down organization of the cytoplasmic labels with respect to that schematized in Fig. 9B could also be compatible with the calculated distances. We find the proposed location of the amino and carboxy termini towards the central core as the most probable arrangement of the channel protein for three reasons. First, placing the 345 position away from the channel core and the carboxy end close to it would imply a very long distance between the limit of the first transmembrane helix and residue 345, due to the ≈10 nm vertical separation reported here between the 345 and the carboxy planes, plus an additional separation from the membrane surface (top vertical arrow and question mark in Fig. 9B), corresponding to the cavity that separates the cytoplasmic domains from the transmembrane core in the two-layered architecture of the HERG-related Kv and CNG channels [4,56,65,66]. Second, residue 345 lies only a few amino acids away from the short HERG sequence (residues 362–366) recently recognized as a key modulator of HERG activation by electrostatic interactions with the gating machinery in the channel core [21,37]. Third, the closest position of the amino termini towards the central channel core as shown in Fig. 9 is mostly compatible with the previously proposed interaction(s) of the initial part of the EAG/PAS domain with the transmembrane channel structure [22,29,31,35]. It is also tempting to speculate that the position of the 345 label, closer to the membrane surface but sizeably rotated with respect to the amino ends might be related to the presence of a pathway allowing for a physical interaction between the initial portion of the amino terminus and the gating machinery, likely at the level of the S4–S5 loop [22,29,35]. It is possible that in this case, the position of residue 345 above the amino terminus could be due to its location in the connectors linking the transmembrane core and the hanging bulk of the cytoplasmic domains [4,56,65,66].

We believe that the qualitative features of this model certainly provide a useful initial constraint on the coarse structure of the channel oligomer, clarifying the relative arrangement of some key landmarks on the cytoplasmic domains of HERG. Even though our data were obtained with large fluorophores, making it possible that they are forced into a limited number of vacant spaces in the channel periphery, our results delimit at least two clearly differentiated and spatially separated spots for the amino and the carboxy ends of the protein. Additional triangulation with other members of our fluorescent HERG channel library using the general methodology depicted here should render very helpful data to position other parts of the protein. On the other hand, it can be anticipated that our collection of

HERG fusion proteins could constitute an excellent basis for substituting the GFP variants with shorter peptides to which small fluorophores such as biarsenical dyes [67] can be specifically attached. The use of these smaller fluorophores combined with the procedures, triangulations and expressions detailed in this report could also help to confirm the relative dimensions reported here.

## Acknowledgments

We thank Dr. Hugo Cabedo from University Miguel Hernández in Alicante (Spain) the gift of the N-terminal-tagged VR1 construct. We also thank Dr. Luisa María Sierra for her geometrical considerations. This work was supported by grants SAF2003–00329 from Ministerio de Ciencia y Tecnología and BFU2006–10936 from Ministerio de Educación y Ciencia of Spain (both partially co-financed by FEDER European funds), and grant IB05–002 from Principado de Asturias (Spain). Finance support from Dirección General de Universidades e Investigación de Asturias for acquisition of the image equipment (ref. EQPT02–36) is also acknowledged. P.M. holds a predoctoral fellowship from FICYT of Asturias (ref. BP03–108). D.G.M. and C.A.R. are predoctoral fellows from the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología (refs. AP2000–4363 and BES–2004–3872).

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bbamcr.2008.06.009.

## References

- [1] F.M. Ashcroft, From molecule to malady, *Nature* 440 (2006) 440–447.
- [2] G. Yellen, The voltage-gated potassium channels and their relatives, *Nature* 419 (2002) 35–42.
- [3] M. Ju, L. Stevens, E. Leadbitter, D. Wray, The roles of N- and C-terminal determinants in the activation of the Kv1.2 potassium channel, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 12769–12778.
- [4] O. Sokolova, A. Accardi, A.D. Gutierrez, A. Lau, M. Rigney, N. Grigorieff, Conformational changes in the C terminus of Shaker K<sup>+</sup> channel bound to the rat Kvβ2-subunit, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (2003) 12607–12612.
- [5] L.A. Kim, J. Furst, D. Gutierrez, M.H. Butler, S. Xu, S.A.N. Goldstein, N. Grigorieff, Three-dimensional structure of I<sub>to</sub>: Kv4.2-KChIP2 ion channels by electron microscopy at 21 Å resolution, *Neuron* 41 (2004) 513–519.
- [6] B. Callsen, D. Isbrandt, K. Sauter, L.S. Hartmann, O. Pongs, R. Bähring, Contribution of N- and C-terminal Kv4.2 channel domains to KChIP channel interaction, *J. Physiol. (Lond.)* 568 (2005) 397–412.
- [7] T.P. Roosild, K-T. Lê, S. Choe, Cytoplasmic gatekeepers of K<sup>+</sup>-channel flux: a structural perspective, *Trends Biochem. Sci.* 29 (2004) 39–45.
- [8] N. García-Sanz, A. Fernández-Carvajal, C. Morenilla-Palao, R. Planells-Cases, E. Fajardo-Sánchez, G. Fernández-Ballester, A. Ferrer-Montiel, Identification of a tetramerization domain in the C terminus of the vanilloid receptor, *J. Neurosci.* 24 (2004) 5307–5314.
- [9] J.W. Taraska, W.N. Zagotta, Cyclic nucleotide-regulated ion channels: spotlight on symmetry, *Structure* 15 (2007) 1023–1024.
- [10] W.N. Zagotta, N.B. Olivier, K.D. Black, E.C. Young, R. Olson, E. Gouaux, Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels, *Nature* 425 (2003) 200–205.
- [11] Q. Gong, D.R. Keeney, J.C. Robinson, Z. Zhou, Defective assembly and trafficking of mutant HERG channels with C-terminal truncations in long QT syndrome, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 37 (2004) 1225–1233.
- [12] S. Kupershmidt, T. Yang, S. Chanthapahyachith, Z. Wang, J.A. Towbin, D.M. Roden, Defective human ether-a-go-go-related gene trafficking linked to an endoplasmic reticulum retention signal in the C terminus, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 27442–27448.
- [13] F. Shoeb, A.P. Malykhina, H.I. Akbarali, Cloning and functional characterization of the smooth muscle ether-a-go-go-related gene K<sup>+</sup> channel, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 2503–2514.
- [14] A. Akhavan, R. Atanasiu, T. Noguchi, W. Han, N. Holder, A. Shrier, Identification of the cyclic-nucleotide-binding domain as a conserved determinant of ion-channel cell-surface localization, *J. Cell. Sci.* 118 (2005) 2803–2812.
- [15] A.D.C. Paulussen, A. Raes, R.J. Jongbloed, R.A.H.J. Gilissen, A.A.M. Wilde, D.J. Snyders, H.J.M. Smeets, J. Aerssens, HERG mutation predicts short QT based on channel kinetics but causes long QT by heterotetrameric trafficking deficiency, *Cardiovasc. Res.* 67 (2005) 467–475.
- [16] X. Li, J. Xu, M. Li, The human Δ1261 mutation of the HERG potassium channel results in a truncated protein that contains a subunit interaction domain and decreases the channel expression, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 705–708.

- [17] P. Phartiyal, E.M.C. Jones, G.A. Robertson, Heteromeric assembly of HERG 1a/1b channels occurs cotranslationally via amino terminal interactions, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 9874–9882.
- [18] J.H. Morais-Cabral, A. Lee, S.L. Cohen, B.T. Chait, M. Li, R. MacKinnon, Crystal structure and functional analysis of the HERG potassium channel N terminus: a eukaryotic PAS domain, *Cell* 95 (1998) 649–655.
- [19] R. Schönherr, S.H. Heinemann, Molecular determinants for activation and inactivation of HERG, a human inward rectifier potassium channel, *J. Physiol. (Lond.)* 493 (1996) 635–642.
- [20] P.S. Spector, M.E. Curran, A. Zou, M.T. Keating, M.C. Sanguinetti, Fast inactivation causes rectification of the IKr channel, *J. Gen. Physiol.* 107 (1996) 611–619.
- [21] C.G. Vilorio, F. Barros, T. Giráldez, D. Gómez-Varela, P. de la Peña, Differential effects of amino-terminal distal and proximal domains in the regulation of human *erg* K<sup>+</sup> channel gating, *Biophys. J.* 79 (2000) 231–246.
- [22] J. Wang, M.C. Trudeau, A.M. Zappia, G.A. Robertson, Regulation of deactivation by an amino terminal domain in Human ether-a-go-go-related gene potassium channels, *J. Gen. Physiol.* 112 (1998) 637–647.
- [23] D.L. Minor Jr, Potassium channels: life in the post-structural world, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11 (2001) 408–414.
- [24] A. Varshney, M.K. Mathew, A tale of two tails: cytosolic termini and K<sup>+</sup> channel function, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 83 (2003) 153–170.
- [25] J.W. Warmke, B. Ganetzky, A family of potassium channel genes related to EAG in *Drosophila* and mammals, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 (1994) 3438–3442.
- [26] M.C. Sanguinetti, M. Tristani-Firouzi, hERG potassium channels and cardiac arrhythmia, *Nature* 440 (2006) 463–469.
- [27] E. Wanke, R. Restano-Cassulini, Toxins interacting with ether-a-go-go-related gene voltage-dependent potassium channels, *Toxicol.* 49 (2006) 239–248.
- [28] E. Raschi, V. Vasina, E. Poluzzi, F. De Ponti, the hERG K<sup>+</sup> channel: target and antitarget strategies in drug development, *Pharmacol. Res.* 57 (2008) 181–195.
- [29] M.C. Sanguinetti, Q.P. Xu, Mutations of the S4-S5 linker alter activation properties of HERG potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes, *J. Physiol. (Lond.)* 514 (1999) 667–675.
- [30] P.L. Smith, G. Yellen, Fast and slow voltage sensor movements in HERG potassium channels, *J. Gen. Physiol.* 119 (2002) 275–293.
- [31] J. Liu, M. Zhang, M. Jiang, G-N. Tseng, Negative charges in the transmembrane domains of the HERG K channel are involved in the activation- and deactivation-gating processes, *J. Gen. Physiol.* 121 (2003) 599–614.
- [32] D.R. Piper, W.A. Hinz, C.K. Tallurri, M.C. Sanguinetti, M. Tristani-Firouzi, Regional specificity of hERG channel activation and inactivation gating, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 7206–7217.
- [33] M. Zhang, J. Liu, G-N. Tseng, Gating charges in the activation and inactivation processes of the HERG channel, *J. Gen. Physiol.* 124 (2004) 703–718.
- [34] T. Ferrer, J. Rupp, D.R. Piper, M. Tristani-Firouzi, The S4-S5 linker directly couples voltage sensor movement to the activation gate in the human ether-a-go-go-related gene (hERG) K<sup>+</sup> channel, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 12858–12864.
- [35] J. Wang, C.D. Myers, G.A. Robertson, Dynamic control of deactivation gating by a soluble amino-terminal domain in HERG K<sup>+</sup> channels, *Biophys. J.* 115 (2000) 749–758.
- [36] J. Chen, A. Zou, I. Splawski, M.T. Keating, M.C. Sanguinetti, Long QT syndrome-associated mutations in the Per-Arnt-sim (PAS) domain of HERG potassium channels accelerate deactivation, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 10113–10118.
- [37] J.B. Saenen, A.J. Labro, A. Raes, D.J. Snyders, Modulation of HERG gating by a charge cluster in the N-terminal proximal domain, *Biophys. J.* 91 (2006) 4381–4391.
- [38] D. Gómez-Varela, F. Barros, C.G. Vilorio, T. Giráldez, D.G. Manso, S.G. Dupuy, P. Miranda, P. de la Peña, Relevance of the proximal domain in the amino-terminus of HERG channels for regulation by a phospholipase C-coupled hormone receptor, *FEBS Lett.* 535 (2003) 125–130.
- [39] D. Gómez-Varela, P. de la Peña, J. García, T. Giráldez, F. Barros, Influence of amino-terminal structures on kinetic transitions between several closed and open states in human *erg* K<sup>+</sup> channels, *J. Membrane Biol.* 187 (2002) 117–133.
- [40] D.L. Sheridan, C.H. Berlot, A. Robert, F.M. Inglis, K.B. Jakobsdottir, J.R. Howe, T.E. Hughes, A new way to rapidly create functional, fluorescent fusion proteins: random insertion of GFP with an in vitro transposition reaction, *BMC Neurosci.* 3 (2002) 7.
- [41] T. Giráldez, T.E. Hughes, F.J. Sigworth, Generation of functional fluorescent BK channels by random insertion of GFP variants, *J. Gen. Physiol.* 126 (2005) 429–438.
- [42] A. Miyawaki, R.Y. Tsien, Monitoring protein conformations and interactions by fluorescence resonance energy transfer between mutants of green fluorescence protein, *Meth. Enzymol.* 327 (2000) 472–500.
- [43] M.G. Erickson, B.A. Alseikhan, B.Z. Peterson, D.T. Yue, Preassociation of calmodulin with voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels revealed by FRET in single living cells, *Neuron* 31 (2001) 973–985.
- [44] R.N. Day, F. Schaufele, Imaging molecular interactions in living cells, *Mol. Endocrinol.* 19 (2005) 1675–1686.
- [45] E.B. Van Munster, G.J. Kremers, M.J.W. Adjobo-Hermans, T.W.J. Gadella Jr, Fluorescence resonance energy transfer (FRET) measurement by gradual acceptor photobleaching, *J. Microsc.* 218 (2005) 253–262.
- [46] C.L. Takanishi, E.A. Bykoiva, W. Cheng, J. Zheng, GFP-based FRET analysis in live cells, *Brain Res.* 1091 (2006) 132–139.
- [47] P. Miranda, T. Giráldez, P. de la Peña, D.G. Manso, C. Alonso-Ron, D. Gómez-Varela, P. Domínguez, F. Barros, Specificity of TRH receptor coupling to G-proteins for regulation of *ERG* K<sup>+</sup> channels in GH<sub>3</sub> rat anterior pituitary cells, *J. Physiol. (Lond.)* 566 (2005) 717–736.
- [48] V. Raicu, D.B. Jansma, R.J.D. Miller, J.D. Friesen, Protein interaction quantified in vivo by spectrally resolved fluorescence resonance energy transfer, *Biochem. J.* 385 (2005) 265–277.
- [49] T. Zal, N.R.J. Gascoigne, Photobleaching-corrected FRET efficiency imaging of live cells, *Biophys. J.* 86 (2004) 3923–3939.
- [50] H. Amiri, G. Schultz, M. Schaefer, FRET-based analysis of TRPC subunit stoichiometry, *Cell Calcium* 33 (2003) 463–470.
- [51] G.H. Patterson, D.W. Piston, B.G. Barisas, Förster distances between green fluorescent protein pairs, *Anal. Biochem.* 284 (2000) 438–440.
- [52] E. Biener-Ramajunan, V.K. Ramajunan, B. Herman, A. Gertler, Spatio-temporal kinetics of growth hormone receptor signalling in single cells using FRET microscopy, *Growth Horm. IGF Res.* 16 (2006) 247–257.
- [53] B. Corry, D. Jayatilaka, P. Rigby, A flexible approach to the calculation of resonance energy transfer efficiency between multiple donors and acceptors in complex geometries, *Biophys. J.* 89 (2005) 3822–3836.
- [54] E.A. Jares-Erijman, T.M. Jovin, FRET imaging, *Nat. Biotechnol.* 21 (2003) 1387–1395.
- [55] B. Adair, R. Nunn, S. Lewis, I. Dukes, L. Philipson, M. Yeager, Single particle image reconstruction of the human recombinant Kv2.1 channel, *Biophys. J.* 94 (2008) 2106–2114.
- [56] S.B. Long, E.B. Campbell, R. MacKinnon, Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K<sup>+</sup> channel, *Science* 309 (2005) 897–903.
- [57] D.A. Doyle, J. Morais-Cabral, R.A. Puetzner, A. Kuo, J.M. Gulbis, S.L. Cohen, B.T. Chait, R. MacKinnon, The structure of the potassium channel: Molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity, *Science* 280 (1998) 69–77.
- [58] G.M. Clayton, S. Altieri, L. Heginbotham, V.M. Unger, J.H. Morais-Cabral, Structure of the transmembrane regions of a bacterial cyclic nucleotide-regulated channel, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 105 (2008) 1511–1515.
- [59] K.V. Craven, W.N. Zagotta, Salt bridges and gating in the COOH-terminal region of HCN2 and CNGA1 channels, *J. Gen. Physiol.* 124 (2004) 663–677.
- [60] L. Stryer, Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler, *Ann. Rev. Biochem.* 47 (1978) 819–846.
- [61] R.M. Clegg, Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids, *Meth. Enzymol.* 211 (1992) 353–388.
- [62] P.R. Selvin, Fluorescence resonance energy transfer, *Meth. Enzymol.* 246 (1995) 300–334.
- [63] I. Riven, E. Kalmanzon, L. Segev, E. Reuveny, Conformational rearrangements associated with the gating of the G protein-coupled potassium channel revealed by FRET microscopy, *Neuron* 38 (2003) 225–235.
- [64] J. Zheng, M.D. Varum, W.N. Zagotta, Disruption of an intersubunit interaction underlies Ca<sup>2+</sup>-calmodulin modulation of cyclic nucleotide-gated channels, *J. Neurosci.* 23 (2003) 8167–8175.
- [65] M.K. Higgins, D. Weitz, T. Warne, G.F.X. Schertler, U.B. Kaupp, Molecular architecture of a retinal cGMP-gated channel: the arrangement of the cytoplasmic domains, *EMBO J.* 21 (2002) 2087–2094.
- [66] M. Pioletti, F. Findeisen, G.L. Hura, D.L. Minor Jr., Three-dimensional structure of the KchIP-Kv4.3 T1 complex reveals a cross-shaped octamer, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13 (2006) 987–995.
- [67] B.R. Martin, B.N.G. Giepmans, S.R. Adams, R.Y. Tsien, Mammalian cell-based optimization of the biarsenical-binding tetracysteine motif for improved fluorescence and affinity, *Nat. Biotechnol.* 23 (2005) 1308–1314.



# Participation of HERG channel cytoplasmic structures on regulation by the G protein-coupled TRH receptor

Carlos Alonso-Ron · Francisco Barros ·  
Diego G. Manso · David Gómez-Varela ·  
Pablo Miranda · Luis Carretero · Pedro Domínguez ·  
Pilar de la Peña

Received: 15 July 2008 / Revised: 17 September 2008 / Accepted: 8 October 2008  
© Springer-Verlag 2008

**Abstract** Human *ether-a-go-go*-related gene (HERG) channels heterologously expressed in *Xenopus* oocytes are regulated by the activation of G protein-coupled hormone receptors that, like the thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor, activate phospholipase C. Previous work with serially deleted HERG mutants suggested that residues 326–345 located in the proximal domain of the channels amino terminus might be required for the hormonal modulation of HERG activation. Generation of new channel mutants deleted in this region further point to the amino acid sequence between residues 326 and 332 as a possible determinant of the TRH effects, but individual or combined single-point mutations in this sequence demonstrate that maintenance of its consensus sites for phosphorylation and/or interaction with regulatory components is not important for the modulatory response(s). The TRH-induced effects also remained unaltered when a basic amino acid cluster located between residues 362 and 366 is eliminated. Additionally, no effect of TRH was observed in channels carrying single-point mutations at the beginning of the intracellular loop linking transmembrane domains S4 and S5. Our results indicate that a correct structural arrangement of the amino terminal domains is essential for the hormone-induced modifications of HERG activation. They also suggest that the hormonal regulatory action is transmitted

to the transmembrane channel core through interactions between the cytoplasmic domains and the initial portion of the S4–S5 linker.

**Keywords** HERG · Potassium channel · Gating · Hormonal regulation · Cytoplasmic domains · Amino terminus · S4–S5 linker

## Introduction

*Ether-a-go-go*-related gene (ERG) potassium channels play a key role setting the electrical behavior of a variety of cell types [2, 3, 5, 8, 13, 28, 31, 35]. The human ERG (HERG) channel mediates the cardiac repolarizing current I<sub>Kr</sub> [33, 41]. Reduction of this current due to mutations in HERG or to channel blockade by cardiac and noncardiac drugs causes congenital type 2 long QT and most of the acquired long QT syndromes, respectively [9, 14, 20, 29, 30, 33, 43]. Long QT syndrome is a clinical disorder characterized by prolongation of the QT interval on the electrocardiogram, associated with an increased risk of life-threatening arrhythmias [30, 37, 43]. It is known that many cardiac events in patients with long QT syndrome including the HERG-associated congenital type 2 long QT occur during physical or emotional stress (reviewed in [27, 30, 37]), suggesting a link between  $\beta$ - and/or  $\alpha$ -adrenergic stimulation and the pathological manifestation of the disease. The regulation of HERG currents by cAMP through direct and protein kinase A-mediated mechanisms triggered by  $\beta$ -adrenergic activation has been reported (reviewed in [23, 39]). It has also been demonstrated, both in heterologous expression systems and cardiomyocytes, that the activation of phospholipase C (PLC)-coupled receptors [such as cardiac  $\alpha$ 1A-adrenergic,  $\alpha$ 1C-adrenergic, and thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptors] and the activation of

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00424-008-0599-x) contains supplementary material, which is available to authorized users.

C. Alonso-Ron · F. Barros (✉) · D. G. Manso ·  
D. Gómez-Varela · P. Miranda · L. Carretero · P. Domínguez ·  
P. de la Peña

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Edificio  
Santiago Gascón, Campus del Cristo, Universidad de Oviedo,  
E-33006 Oviedo, Asturias, Spain  
e-mail: fbarros@uniovi.es

protein kinase C cause HERG current reductions and a positive shift in the HERG activation curve [4, 6, 18, 38]. Interestingly,  $\beta$ -blockers remain the mainstay of long-term therapy for long QT patients [30, 37, 43]. However, the response of type 2 HERG-associated long QT patients to these agents is less complete than that of type 1 long QT patients [37], and in these cases, a combination of  $\beta$ -blockade and left cardiac sympathetic denervation that would also block  $\alpha$ -adrenergic pathways appears to provide significant additional protection [26, 37, 43]. Therefore, it is of great interest to better understand the molecular reasons for the effects of PLC-coupled receptor activation on HERG properties.

We have previously demonstrated that activation of PLC-coupled receptors, such as TRH and serotonin-1c receptors coexpressed in *Xenopus* oocytes with HERG channels, modifies HERG channel gating slowing activation, accelerating deactivation, and shifting the activation voltage dependence in the depolarizing direction [4, 16]. Similar effects on activation have been reported in response to  $\alpha$ -adrenergic receptor stimulation and to protein kinase C activation with phorbol esters [18, 38]. ERG channels endogenously expressed in adenohipophyseal cells are also similarly modulated by TRH [17, 25, 36]. In an attempt to characterize the structural requirements for hormonal regulation of channel activation, we used channel variants carrying serial deletions in the proximal domain of the HERG amino terminus extending from several positions in the channel sequence up to residue 373 near the first transmembrane helix [16]. Based on the fact that normal hormonal responses are observed with channels lacking the protein segment corresponding to residues 345–373, but that the TRH-induced modifications in activation properties are virtually abolished when an additional segment (residues 326–373) is deleted, we concluded that the sequence extending from residues 326 to 345 is essential for the hormonal modulation of HERG activation [16]. To further identify the minimal amino acid sequence required for the hormonal effects, in this study, we used a new HERG variant lacking residues 333 to 373. Since the TRH-induced effects in activation were totally normal in the  $\Delta$ 333–373 mutant but were lacking in the  $\Delta$ 326–373 construct, this initially suggested a requirement of the 326–332 sequence for the hormonal effects to take place. Surprisingly, introduction into this sequence of single- or combined-point mutations leading to disruption of consensus sites for phosphorylation by different protein kinases or for interaction with regulatory components such as 14-3-3 proteins and inositol phospholipids did not modify the TRH-induced responses. Also, the identification of a positively charged amino acid cluster (residues 362–366 near the S1 segment) as an important determinant of HERG activation characteristics [32], prompted us to evaluate its significance for hormonal modulation of activation gating, either alone or in

combination with the 326–332 sequence. Finally, introduction of single-point mutations in the initial portion of the intracellular loop that links HERG transmembrane domains S4 and S5 abolished the hormonal effects. Our results suggest that the effect of the amino terminal deletions antagonizing the TRH-induced regulation of HERG is not mainly due to elimination of specific amino acid sequences, but instead results from structural modifications in the cytoplasmic domains and/or disruption of their normal positioning toward the transmembrane channel core. Furthermore, we identify the initial portion of the S4–S5 HERG linker as a key point for transmission of the regulatory actions triggered by activation of the PLC-coupled receptors from the cytoplasmic domains to the channel core.

## Materials and methods

### Plasmids and preparation of cRNA

The original plasmid containing the cDNA for the HERG channel was a generous gift of Dr. E. Wanke (University of Milan, Italy). Isolation of the TRH-R cDNA has been described previously [10]. For in vitro cRNA synthesis, HERG constructs cloned in the psP64A<sup>+</sup> vector were linearized and capped cRNA was synthesized from the linear cDNA templates by standard methods using SP6 RNA polymerase as described previously [4, 10, 11].

### Generation of HERG channel mutants

Procedures for the generation of the  $\Delta$ 2–135,  $\Delta$ 138–373, and  $\Delta$ 326–373 variants have been detailed elsewhere [1, 15, 42]. Variant  $\Delta$ 333–373 was constructed in a similar way using a forward polymerase chain reaction (PCR) primer containing a *Hind*III site and including the coding sequence for the first six residues of HERG (5'-TTG AAG CTT CTC AGG ATG CCG GTG CGG AGG GGC-3') and a reverse primer containing the coding sequence corresponding to amino acids 325–332 followed by a 9-bp sequence corresponding to amino acids 374–376 and with a unique *Bst*EII site (5'-CTG GGT GAC CTT GTC AAT GGT GCG GTA GCG CAC G-3'). Variant  $\Delta$ 345–373 was generated in a similar way using a PCR reverse primer containing HERG coding sequence corresponding to residues 338–344 followed by the 9-bp sequence containing the unique *Bst*EII site (5'-CTG GGT GAC CTT GAG GTC CAC AAA GTT GAG G-3'). Construction of variant  $\Delta$ 326–341 was performed by combining two independent constructs. The first one containing the 342–698 HERG sequence was obtained by PCR using a forward primer containing the *Sal*I site followed by the coding sequence 343–348 (5'-CCG TGT CGA CCT CAA GGG CGA CCC CTT C-3'). The reverse primer

contained the sequence corresponding to residues 694–701 and the unique *XhoI* site in the HERG sequence. The amplification product was digested with *SalI* and *XhoI*, purified, and subcloned into pBluescript KS<sup>+</sup>, yielding the construct pBKS<sup>+</sup> HERG 342–698. The second construct containing the HERG coding sequence from amino acids 1 to 325 and a *SalI* site was obtained by PCR using a forward primer containing the *HindIII* site and covering the 5' end of the HERG cDNA including the initial ATG triplet (5'-TGG AAG CTT CTC AGG ATG CCG GTG CGG AGG GGC CAC-3') and a reverse primer that contained the HERG coding sequence corresponding to residues 319–325 and 342–343 and also a *SalI* site (5'-CCT AGT CGA CGA GGT CGC AGT CCG AGG-3'). The amplification product was digested with *HindIII* and *SalI*, purified, and subcloned into the pBKS+HERG 342–698 construct, yielding the pBKS<sup>+</sup> HERG 1–698 construct with the 326–341 deletion. Finally, the *HindIII/XhoI* fragment of this construct was introduced into the corresponding site of the psP64A<sup>+</sup> plasmid containing the cDNA for the wild-type HERG.

For construction of the InsA/326–341 and InsB/326–341 variants in which the 326–341 sequence is substituted by other sequences unrelated to HERG, a double-chain oligonucleotide 5'-TGC ACC GCT ACC CGT ACG ACG TTC CGG ACT ACG CCA CCC TCA ACT TTG-3' was subcloned into the *SalI* site of the  $\Delta$ 326–341 variant. This oligonucleotide contained a *BsiWI* site and two *SalI* sites at both ends. The sense and antisense oligonucleotides used to generate the double-chain segment were hybridized after phosphorylation with ATP and polynucleotide kinase. Insertion of this double-chain oligonucleotide into the *SalI* site of  $\Delta$ 326–341 was done in both sense and antisense orientation, yielding the InsA/326–341 and InsB/326–341 variants in which the original HERG 326–341 segment is substituted by DRYPYDVP DYATLNFV and DKVEGGVVRNVARVAV sequences, respectively.

Construction of the  $\Delta$ 155–209 variant was also performed by PCR using a forward primer containing the sequence coding for HERG residues 152–154 and 209–215 as well as a *BstXI* site that corresponds to the sequence of residues 152–154 and 209 (5'-CCA GCT GGG TGG ACG TGG ACC TGA CG-3'). The reverse primer contained the coding sequence corresponding to residues 365–372 and a *BstEII* site (5'-GGA CAG GAC CTG GGT GAC CTT CTC-3'). The PCR product digested with *BstXI* and *BstEII* was gel-purified and substituted into the wild-type psP64A<sup>+</sup> HERG.

The point mutants D540C, R541H, and Y542C were created by site-directed mutagenesis using the PCR-based overlap extension method as previously described [1, 15, 42]. The resulting PCR products were digested with *BstEII/XhoI* and ligated into *BstEII/XhoI*-digested wild-type psP64A<sup>+</sup> HERG.

All constructs were sequenced to confirm the mutations and to ensure the absence of frame errors.

## Expression of receptors and HERG channel variants and current recording conditions in *Xenopus* oocytes

Procedures for frog anesthesia and surgery, obtaining oocytes and microinjection, have been detailed elsewhere [1, 4, 11, 12, 15, 16, 42]. Oocytes were maintained in OR-2 medium (in millimolar: NaCl 82.5, KCl 2, CaCl<sub>2</sub> 2, MgCl<sub>2</sub> 2, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1, HEPES 10, at pH 7.5). Cytoplasmic microinjections were performed with 30–50 nL of in vitro synthesized cRNA per oocyte. HERG currents were studied in manually defolliculated oocytes [4]. Unless otherwise specified, recordings were obtained in high-K<sup>+</sup> medium in which 50 mM KCl substituted an equivalent amount of NaCl to maximize tail current magnitude at negative repolarizing potentials and/or to obtain an adequate current magnitude with those mutants showing lower expression levels. The amount of cRNA was calibrated to maintain inward current levels in the 1–6  $\mu$ A range at repolarizing voltages around –100 mV to ensure proper voltage control. Functional expression was typically assessed 2–3 days after microinjection. Recordings were made at room temperature using the two-electrode voltage clamp method with a Turbo TEC01C amplifier (NPI, Tamm, Germany) as described previously [1, 4, 15, 16, 42]. Membrane potential was typically clamped at –80 mV except for constructs  $\Delta$ 138–373,  $\Delta$ 326–373,  $\Delta$ 333–373, and  $\Delta$ 345–373 in which a –100/–110-mV basal voltage was used to compensate for the left shift in voltage dependence of activation caused by the deletions. This ensures that, in all cases, the whole channel population remains closed at the holding potential used. TRH data collection started 2 min after adding the hormone. Stimulation and data acquisition were controlled with Pulse+PulseFit software (HEKA Elektronik, Lambrecht, Germany) running on Macintosh computers. Ionic currents sampled at 1 KHz were elicited using the voltage protocols indicated in the graphs. Data analysis and exponential fits to ionic currents were performed with the programs PulseFit (HEKA Elektronik) and Igor-Pro (WaveMetrics, Lake Oswego, OR, USA). A *P/n* method was used for leak and capacitive current subtraction. Kinetic parameters of activation and deactivation were obtained as previously described [1, 16, 42]. The voltage dependence of current activation was assessed using standard tail current analysis. Tail current magnitudes normalized to maximums were fitted with a Boltzmann function:

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

where *V* is the test potential, *V*<sub>1/2</sub> is the half-activation voltage, and *k* is the slope factor. The time course of voltage-dependent activation was studied using indirect envelope of tail current protocols, varying the duration of depolarizing prepulses, and following the magnitude of



the tail currents upon repolarization. The time necessary to reach a half-maximal tail current magnitude was used to compare the speed of activation for the different channel variants.

### Statistics

Data are presented as the means  $\pm$  standard error of the mean with the number of oocytes indicated in the graphs. Significance level is indicated by *P*. Comparisons were performed with the InStat program (GraphPad Software) by the parametric Student's unpaired *t* test (two-tailed) except in cases in which significant differences in standard deviations were present. In these cases, an alternate Welch's test for Gaussian populations with unequal standard deviation was used. *P* values  $<0.05$  were considered as indicative of statistical significance.

## Results

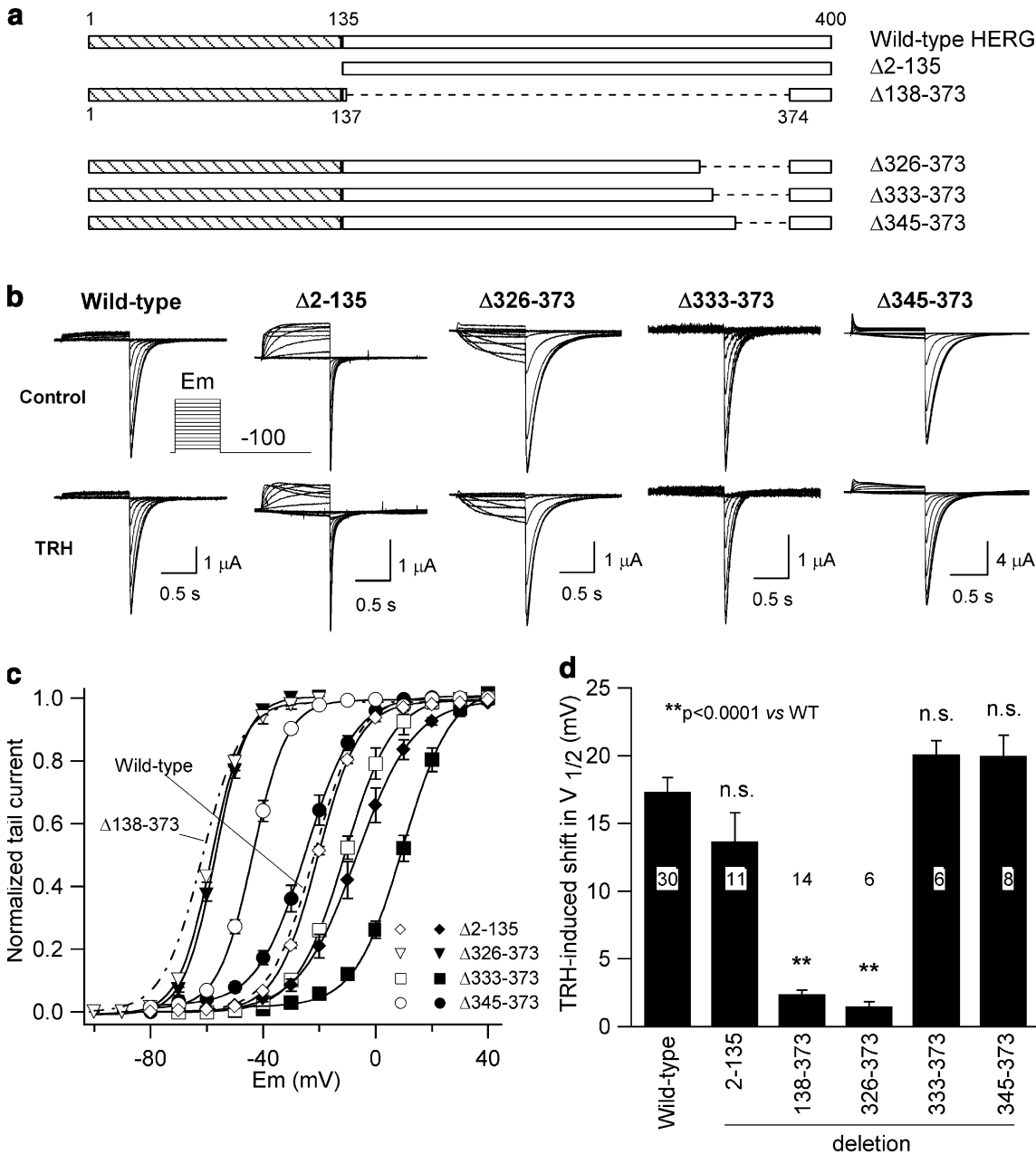
### Effect of amino terminus $\Delta 2$ –135 and $\Delta 333$ –373 deletions on the TRH-induced modifications of HERG activation

Our previous studies to test the relevance of different segments of the HERG amino terminal regions on TRH-induced regulation of activation kinetics indicated that the hormone induces a clear slowing of activation and a marked shift in activation voltage both in wild-type channels and in those lacking residues 345–373 of the proximal domain in the amino terminus, but that the hormonal effect is virtually abolished in those channel variants from which either the 326–373 sequence or a longer amino acid stretch extending up to the whole proximal domain sequence (e.g.,  $\Delta 284$ –373,  $\Delta 223$ –373, and  $\Delta 138$ –373 mutants) is deleted. Since the 345–373 segment is not necessary for the hormonal effects to take place, but the deletion of 19 additional residues ( $\Delta 326$ –373 construct) eliminates such effects, we interpreted that the relatively short sequence extending from residues 326 to 345 is essential for the hormonal modulation of HERG activation [16]. In an attempt to further delimit the specific region involved in the hormonal regulation, in this study, we generated two new constructs: a variant lacking residues 333–373 in the proximal domain and a  $\Delta 2$ –135 channel lacking the *eag*/PAS domain (see the “Materials and methods” section). The activation voltage dependence of these mutants and their modification upon treatment with TRH in oocytes coexpressing the channel and the TRH receptor are compared with those corresponding to the  $\Delta 326$ –373 and  $\Delta 345$ –373 constructs in Fig. 1. It can be observed that, unlike the results obtained with  $\Delta 326$ –373 and  $\Delta 138$ –373 (see also [16]), a shift in activation voltage

dependence analogous to that observed in wild-type HERG (from  $-18.7 \pm 1.1$  mV of  $V_{1/2}$  without hormone to  $-1.4 \pm 1.2$  mV after TRH,  $n=30$ ) is induced by the hormone in the *eag*/PAS-deleted  $\Delta 2$ –135 construct (from  $-20.5 \pm 0.4$  to  $-6.9 \pm 2.3$  mV,  $n=11$ ). This indicates that the *eag*/PAS region is not necessary for the hormonal effect.

Performance of an activation voltage dependence analysis with the  $\Delta 333$ –373 construct in the absence of hormone demonstrates that the activation  $V_{1/2}$  of this variant is slightly shifted ( $\approx 11$  mV) to more depolarized voltages compared to the wild-type. This strongly contrasts with all other mutants with different size proximal domain deletions in which the activation voltage dependence is markedly shifted to more hyperpolarized voltages (e.g., from  $-18.7$  mV in the wild-type to  $-60$  and  $-44$  mV in  $\Delta 326$ –373 and  $\Delta 345$ –373 channels, respectively; see also [16, 42]). Consistent with previous results [32], it is likely that the hyperpolarizing modifications of basal activation voltage dependence in channels lacking the positively charged KIKER sequence (between residues 363 and 367) are compensated by substitution of this sequence by an equivalently positive stretch (RIRTYSK using the one-letter amino acid code) in the  $\Delta 333$ –373 construct, leading to a wild-type behavior. Regardless of the modifications in the *I/V* curves caused by the deletion itself, a prominent shift of  $20.1 \pm 1.0$  mV can be observed (analogous to those obtained with  $\Delta 345$ –373 and wild-type channels) triggered by the hormone in oocytes expressing  $\Delta 333$ –373 channels. It is important to note that: (1) the differences in the basal or hormonally induced behavior of the constructs were not related to the different conditions used for recording membrane currents (i.e., 50 mM KCl) in these experiments, since the position of the *I/V* curves and their displacement in response to TRH addition were the same when  $\Delta 326$ –373 and  $\Delta 333$ –373 currents were recorded in medium containing 2 mM KCl (not shown) and (2) the position of the *I/V* curves along the voltage axis did not act as an important determinant of the hormonal effect, since an analogous shift was observed in  $\Delta 345$ –373 and  $\Delta 333$ –373 channels, in spite of the fact that, in the absence of hormone, their voltage dependencies appeared displaced to hyperpolarizing and depolarizing voltages, respectively, compared with the wild-type channel. In principle, these results would be compatible with the interpretation that the seven amino acid RYRTISK segment corresponding to residues 326–332 could be acting as a determinant of the TRH effects since the hormone-induced response is absent from channels lacking residues 326–373 but is recovered in the  $\Delta 333$ –373 construct.

As a further confirmation of the results obtained by looking at the voltage dependence of activation, we also used the deleted variants to analyze the TRH-induced effects on activation rates. Due to the overlap of relatively



**Fig. 1** Effect of TRH on activation voltage dependence of HERG channels carrying deletions in the amino terminal domains. **a** Schematic diagram of HERG amino terminus in wild-type and deletion mutants. The regions corresponding to the *eag*/PAS (residues 16–135) and the proximal domains up to the first transmembrane helix are shown as *striped* and *white bars*, respectively. The portion corresponding to amino acids 1–16 that remained disordered in the *eag*/PAS crystalline structure [26] is also represented in the scheme. Internal deletions are marked by *dashed lines*. The size of every domain and the lengths of the deletions are represented on a horizontal scale proportional to the total length of the amino terminus. **b** Families of currents obtained in the absence (*Control*, upper part) or the presence of 1 μM TRH (*TRH*, lower part) using the voltage protocol shown in the *inset*. Test pulses were applied once every 20–30 s. Oocytes bathed in high- $K^+$  medium were used for recordings. Note the fast deactivation kinetics exhibited by

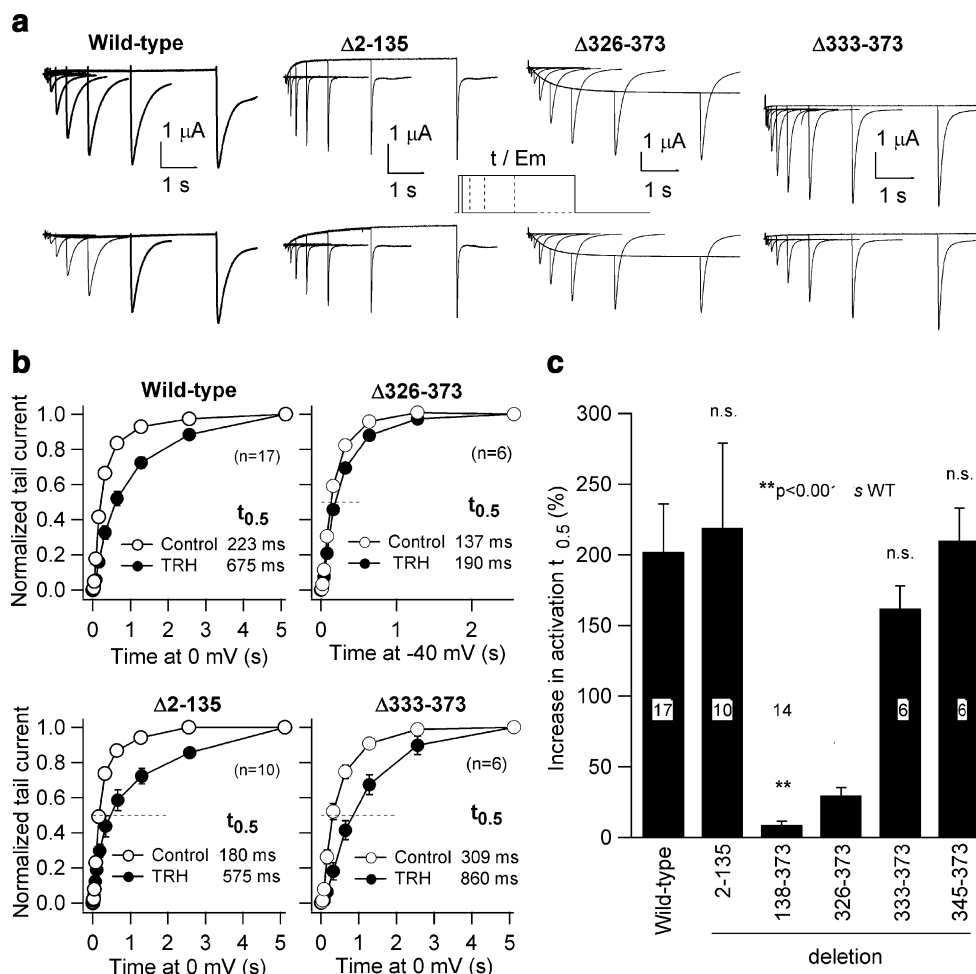
the Δ2–135 construct. **c** Effect of proximal domain deletions on TRH-induced shifts in HERG activation voltage dependence. Averaged data for the number of oocytes indicated in **d** were used to generate the *I/V* curves in the absence (*open symbols*) or the presence (*solid symbols*) of TRH. The *continuous lines* correspond to Boltzmann curves  $h(V) = I_{max} [1 / (1 + \exp((V - V_{1/2})/k))]$ , which best fitted the data with  $V_{1/2}$  of -11 and +10 mV for control and TRH-treated Δ333–373 channels, respectively.  $V_{1/2}$  values of Δ2–135, Δ326–373, and Δ345–373 channels corresponded to -20.5 and -6.9, -60.0 and -58.5, and -44.0 and -24.0 mV in the absence or the presence of TRH, respectively. Boltzmann curves obtained in the absence of TRH from oocytes expressing wild-type and proximal domain-deleted Δ138–373 channels are also included as reference. **d** Comparison of TRH-induced *I/V* shifts on channels with different deletions in the proximal domain. Shifts in  $V_{1/2}$  value for wild-type and Δ138–373 channels [16] are also shown for comparison

slow activation transitions and fast inactivation rates in HERG upon depolarization, we monitored the time course of transitions from closed to open states using an indirect envelope of tail currents protocol, following the increase of tail current magnitude as a result of duration increases in a previous depolarization pulse at a fixed voltage. As shown in Fig. 2, the time necessary to attain a half-maximal tail current was more than twofold longer after addition of TRH to  $\Delta 2-135$  and  $\Delta 333-373$  channels, a result similar to that obtained with wild-type and  $\Delta 345-373$  channels. However, the activation rate remained almost unaltered following hormone addition to channels lacking either the 326–373 segment or most of the proximal domain ( $\Delta 138-373$ ). This confirmed and extended our previous results and indicated

that increasing the length of the deletion by seven additional residues (from  $\Delta 333-373$  to  $\Delta 326-373$ ) causes an almost complete loss of the TRH-induced effects on activation parameters.

Effect of mutations in the 326–332 (RYRTISK) HERG sequence on TRH-induced modifications of activation parameters

The identification of the short RYRTISK sequence corresponding to residues 326–332 as a possible determinant of the hormonal effects opened some a priori exciting and additional possibilities. As a matter of fact, several consensus sequences are localized in this short region



**Fig. 2** Effect of proximal domain modifications on TRH-induced slowing of HERG activation. **a** Time course of voltage-dependent activation obtained in oocytes coexpressing the TRH receptor and the HERG variants indicated at the top, in the absence (Control) or the presence of 1  $\mu$ M TRH studied by varying the duration of a depolarization prepulse according to the voltage protocol shown in the inset. The oocytes were bathed in high- $K^+$  medium for recording currents and the activation time course was followed at 0 mV except with  $\Delta 326-373$  channels in which  $-40$  mV was used to compensate for the shift in voltage dependence of activation exhibited by this

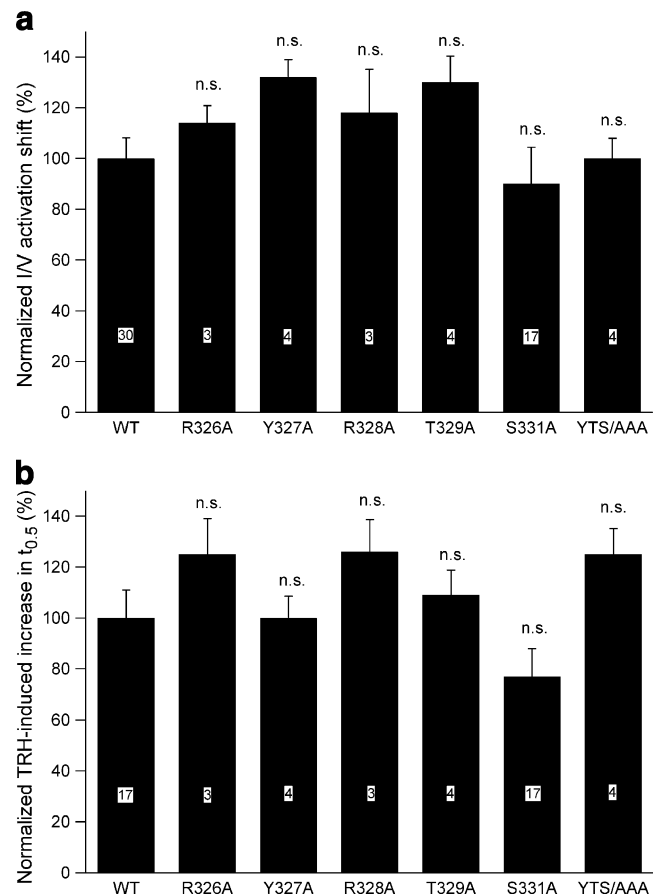
mutant. In all cases, a repolarizing potential of  $-100$  mV was used. **b** Variation in the tail current magnitude upon repolarization. Averaged data normalized to maximum are shown. The time necessary to reach a half-maximal tail current magnitude (dashed lines) is indicated in the graphs. **c** Comparison of TRH effects on activation time course of channels carrying different deletions in the amino terminus. One hundred percent increase corresponds to a doubled  $t_{0.5}$  value. Data for wild-type and  $\Delta 138-373$  channels [16] are also included for comparison. The deletion mutants in this figure correspond to those schematized in Fig. 1a

including phosphorylation sites for tyrosine kinases at Y327, for protein kinase A (RX<sub>1-2</sub>S/TX) and Ca-Calmodulin kinase II (RXXS/TX) at T329, and for protein kinase B/Akt (RXRXXS/T) at S331 [21, 22, 46]. Interestingly, protein kinases A, B, and tyrosine kinase(s) have been proposed as regulators of HERG currents [7, 23, 46]. Furthermore, the presence of three positively charged residues in the seven-residue segment 326–332 constitutes a hypothetical determinant of PIP<sub>2</sub> binding, a putative modulator of HERG channel activity [6]. Finally, the RYRTISK sequence is a variant of the RXXpS/pT motif that constitutes a consensus for interaction with 14-3-3 proteins, also proposed as modulators of HERG [19]. Based on this information, several point mutants were generated in which residues R326, Y327, R328, T329, and S331 were changed to alanine and a triple mutant (YTS/AAA) in which the three putatively phosphorylated residues were simultaneously changed to alanine was constructed. Surprisingly, the modulatory effects of TRH on activation parameters including the slowed activation rate and the shift in activation voltage dependence were not modified by any of the mutations (Fig. 3). This suggests that the impairment of the hormonal effects caused by extending the size of the deletions from residue 333 up to amino acid 326 was not due to the elimination of any of the aforementioned consensus sites, but was possibly related instead to the deletion itself and/or to a general disruption of a structural motif linked to this region in the channel molecule.

As a last test of the real contribution of the 326–332 sequence to the hormonal modulation, the TRH effects were tested in other constructs carrying only a short deletion that includes the 326–332 sequence and its surroundings (construct  $\Delta$ 326–341) and in variants in which the 326–341 sequence was replaced by sequences unrelated to HERG (constructs InsA/326–341 and InsB/326–341, see the “Materials and methods” section). As shown in Fig. 4, deleting the 326–341 segment or exchanging it with other unrelated sequences did not significantly alter the TRH-induced modifications of HERG activation voltage dependence and activation rates. This supports the results obtained with the single-point mutations and unequivocally demonstrates that the amino acid sequence located between positions 325 and 333 does not determine by itself the hormonal regulatory effects.

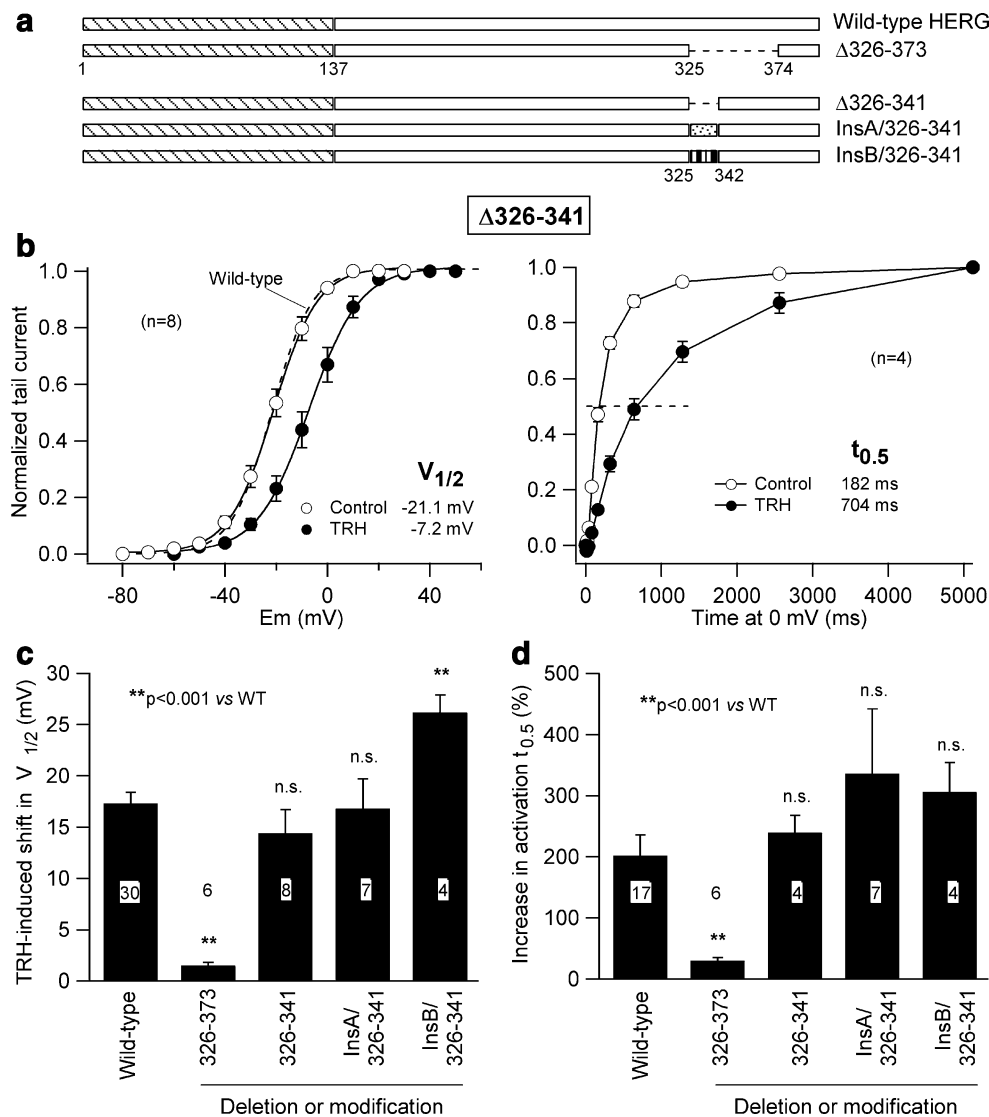
Maintenance of the TRH-induced effects in channels lacking the positively charged amino acid cluster (KIKER sequence) corresponding to residues 362–366

As indicated above, it has been shown that the positively charged KIKER sequence corresponding to residues 362–366 constitutes an important determinant of HERG activation characteristics [32]. Due to their positioning near the



**Fig. 3** Comparison of TRH-induced effects on activation parameters of HERG channels carrying single-point mutations in the 326–332 RYRTISK sequence. **a** Maintenance of TRH-induced shifts in activation voltage dependence after mutation of residues 326, 327, 328, 329, and 331 to alanine. YTS/AAA corresponds to a triple mutant in which residues 327, 329, and 331 were simultaneously changed to alanine. Activation voltage dependence was studied as indicated in Fig. 1. Data normalized to the shift value measured in wild-type channels are presented. *n.s.* not significant vs wild-type. **b** TRH-induced slowing down of HERG activation in the different mutants. Times for half-maximal activation at 0 mV were studied as detailed in Fig. 2. Increases in  $t_{0.5}$  values normalized to that obtained with wild-type channels are shown

sequence(s) that appear to influence the TRH effects, we evaluated the possible significance of those residues for hormonal regulation of activation gating. For this purpose, we first generated two new constructs (Fig. 5a) either by substituting the three basic residues of the KIKER with alanines (KKR/AAA construct) or by introducing a short deletion that included the KIKER sequence ( $\Delta$ 363–373 construct). Additionally, these mutations were combined with the YTS/AAA triple mutant (YTS/AAA+KKR/AAA and YTS/AAA+ $\Delta$ 363–373 constructs) or with the  $\Delta$ 326–341 deletion ( $\Delta$ 326–341+KKR/AAA and  $\Delta$ 326–341+ $\Delta$ 363–373 constructs), both affecting the RIRTYSK sequence. The results obtained with all these constructs are summarized in Figs. 5 and 6. It can be observed that the triple mutant KKR/



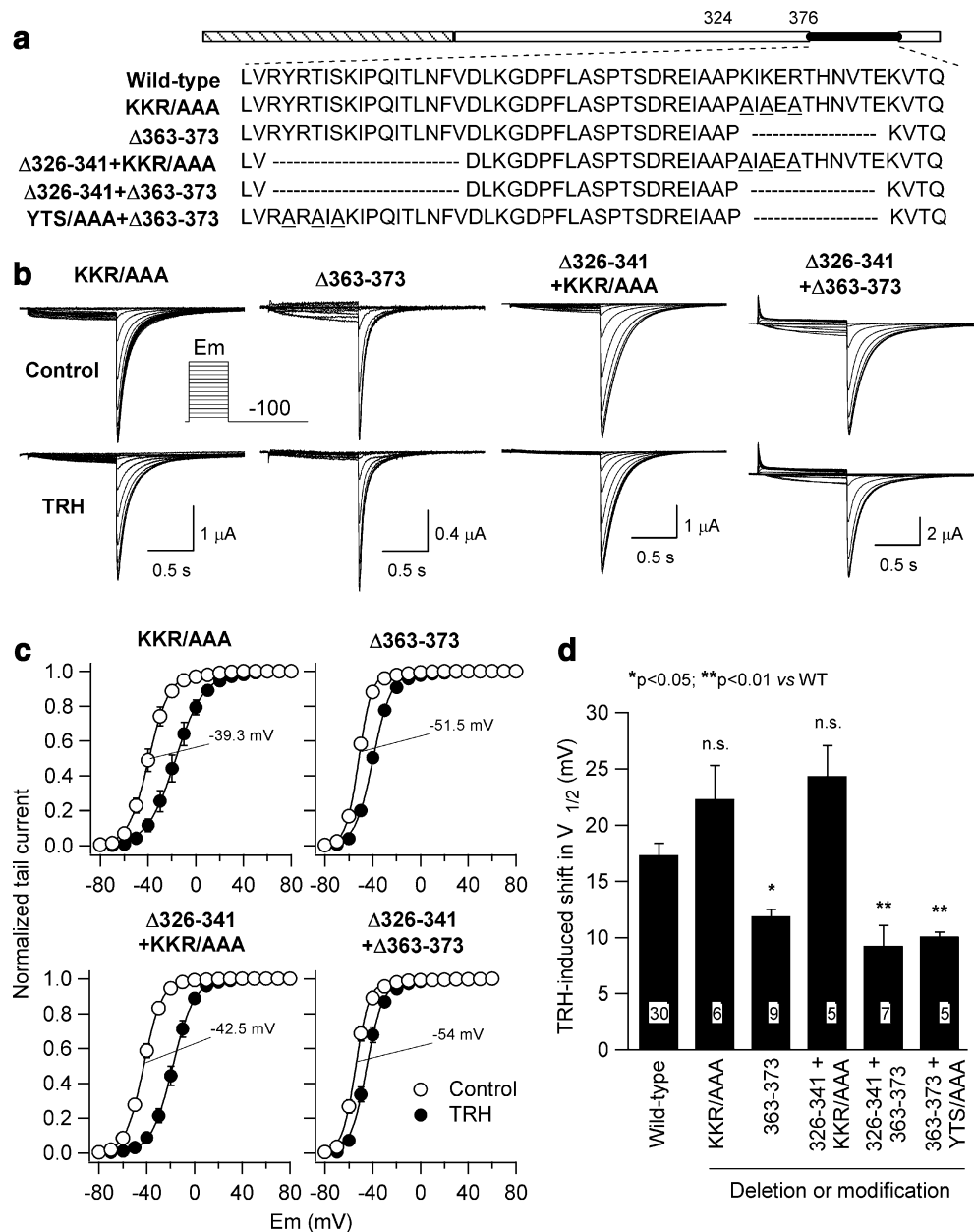
**Fig. 4** Effect of TRH on activation properties of channels with structural modifications around the 326–332 RYRTISK sequence. **a** Schematic diagram of HERG amino terminus in wild-type and modified HERG channels. Deletions are marked by *dashed lines*. Insertions of a HERG-unrelated sequence covering the region deleted in the  $\Delta 326-341$  construct are represented by a *dotted* and a *vertically striped bar* in the InsA/326–341 and the InsB/326–341 variants, respectively. See the “Materials and methods” section for more details about the specific sequences introduced in these constructs. **b** Effect of TRH on activation voltage dependence (*left*) and the activation time course at 0 mV (*right*) of  $\Delta 326-341$  channels. *I/V* curves in the

absence or the presence of 1  $\mu\text{M}$  TRH were generated as detailed in the legend of Fig. 1.  $V_{1/2}$  and  $t_{0.5}$  values with and without TRH are indicated in the graphs. A Boltzmann curve obtained without TRH from oocytes expressing wild-type channels (*dashed line*) is also shown for comparison. Activation time courses were followed as detailed in the legend of Fig. 2. **c** Comparison of TRH-induced shifts in activation voltage dependence. Data for wild-type and  $\Delta 326-373$  channels are also included for clarity. **d** Comparison of TRH-induced slowing of HERG activation at 0 mV. Increases in  $t_{0.5}$  values are shown with a 100% increment representing a doubled half-maximal activation time

AAA shows a negatively shifted voltage dependence of activation ( $V_{1/2} = -39.3 \pm 2.3$  mV,  $n=6$ ;  $P < 0.0001$  vs wild-type). This leftward shift was significantly bigger for the  $\Delta 363-373$  construct ( $V_{1/2} = -51.5 \pm 0.4$  mV,  $n=9$ ;  $P < 0.005$  vs KKR/AAA). Since an equivalent local charge is expected in the region around the 363–373 residues in both channels (Fig. 5a), this indicates that some additional disruption of the normal gating behavior is induced by the deletion. Remarkably, the TRH-induced displacement of the *I/V* curve to

positive potentials remained the same in the KKR/AAA mutant ( $22.3 \pm 3.0$  mV shift) and was only slightly reduced ( $11.9 \pm 0.6$  mV) in the  $\Delta 363-373$  construct (Fig. 5c,d). Similar results for the hormonal effect were obtained when the YTS/AAA or the  $\Delta 326-341$  mutations around the RYRTISK region were combined with the KKR/AAA or the  $\Delta 363-373$  modifications, respectively (Fig. 5d). Altogether, these results suggest that, in spite of its crucial role in setting the basal activation parameters of HERG, the

**Fig. 5** Effect of TRH on activation voltage dependence of HERG channels with modifications around the RYRTISK and KIKER sequences. **a** Schematic diagram of HERG amino terminus and sequence alignment of residues 325–376 in the different constructs. **b** Families of currents obtained in the absence (*Control*, top) or the presence of 1  $\mu$ M TRH (*TRH*, bottom) using the voltage protocol shown in the inset. **c** Comparison of the TRH-induced shifts in HERG activation voltage dependence for different constructs. Averaged data for the number of oocytes indicated in **d** were used to generate the *I/V* curves.  $V_{1/2}$  values before adding TRH are indicated in the graphs. **d** Comparison of TRH-induced *I/V* shifts on channels with different modifications in the region corresponding to the KIKER cluster either alone or combined with mutations in the RYRTISK sequence



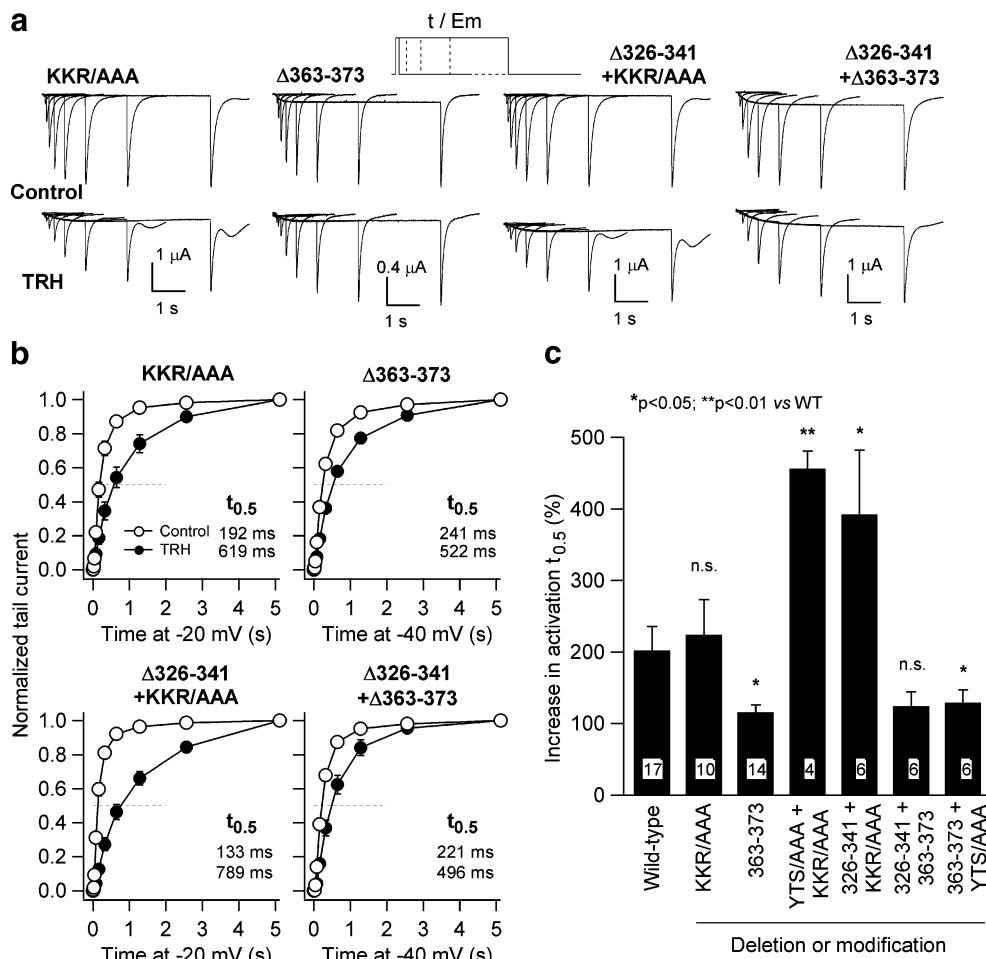
positively charged KIKER sequence does not act as an important determinant of the hormonal regulatory effects on HERG activation behavior.

As an additional indication that the KIKER sequence is not essential for the TRH-induced effects on channel activation, we also compared the influence of the hormonal treatment on the time course of activation using the same constructs (Fig. 6). Again, the slowing of activation gating caused by TRH in the wild-type channel remained the same in the triple mutant KKR/AAA and was slightly reduced to 63% of the control in the  $\Delta$ 363–373 construct. However, such slowing was more pronounced when the KKR/AAA mutant was combined with the YTS/AAA or  $\Delta$ 326–341 modifications in the RYRTISK region. Finally, a slowing of

gating equivalent to that observed in the  $\Delta$ 363–373 construct was obtained when this deletion was combined with the YTS/AAA or the  $\Delta$ 326–341 constructs (Fig. 6b–d).

#### Impairment of the TRH-induced effects in $\Delta$ 155–209 channels

The aforementioned results indicate that, different to our initial supposition (see above), the impairment of the hormonal effects caused by the  $\Delta$ 326–373 and longer amino terminal deletions is not due to the absence of a specific combination of residues, but instead to the size of the deleted region beyond a critical point. This would be coherent with the normal response observed in channels



**Fig. 6** Effect of TRH on the activation time course of HERG channels carrying modifications around the RYRTISK and KIKER sequences. **a** Families of currents obtained in the absence (*Control*, top) or the presence of 1  $\mu\text{M}$  TRH (*TRH*, bottom) using the voltage protocol shown on top. Depolarizing voltages of  $-20$  mV for KKR/AAA and  $\Delta 326-341 + \text{KKR/AAA}$  and  $-40$  mV for  $\Delta 363-373$  and  $\Delta 326-341 + \Delta 363-373$  constructs were used to compensate for the shifts in activation voltage dependence. In all cases, a repolarizing potential of  $-100$  mV was used. **b** Comparison of the activation time courses of different constructs.

Averaged data normalized to maximum are shown. The time necessary to reach a half-maximal tail current magnitude (*dashed lines*) with (*solid symbols*) and without TRH (*open symbols*) is indicated in the graphs. **c** Comparison of TRH effects on activation time course of channels carrying different modifications in the region corresponding to the KIKER cluster either alone or combined with mutations in the RYRTISK sequence. One hundred percent increase corresponds to a doubled  $t_{0.5}$  value. The constructs in this figure correspond to those schematized in Fig. 5a

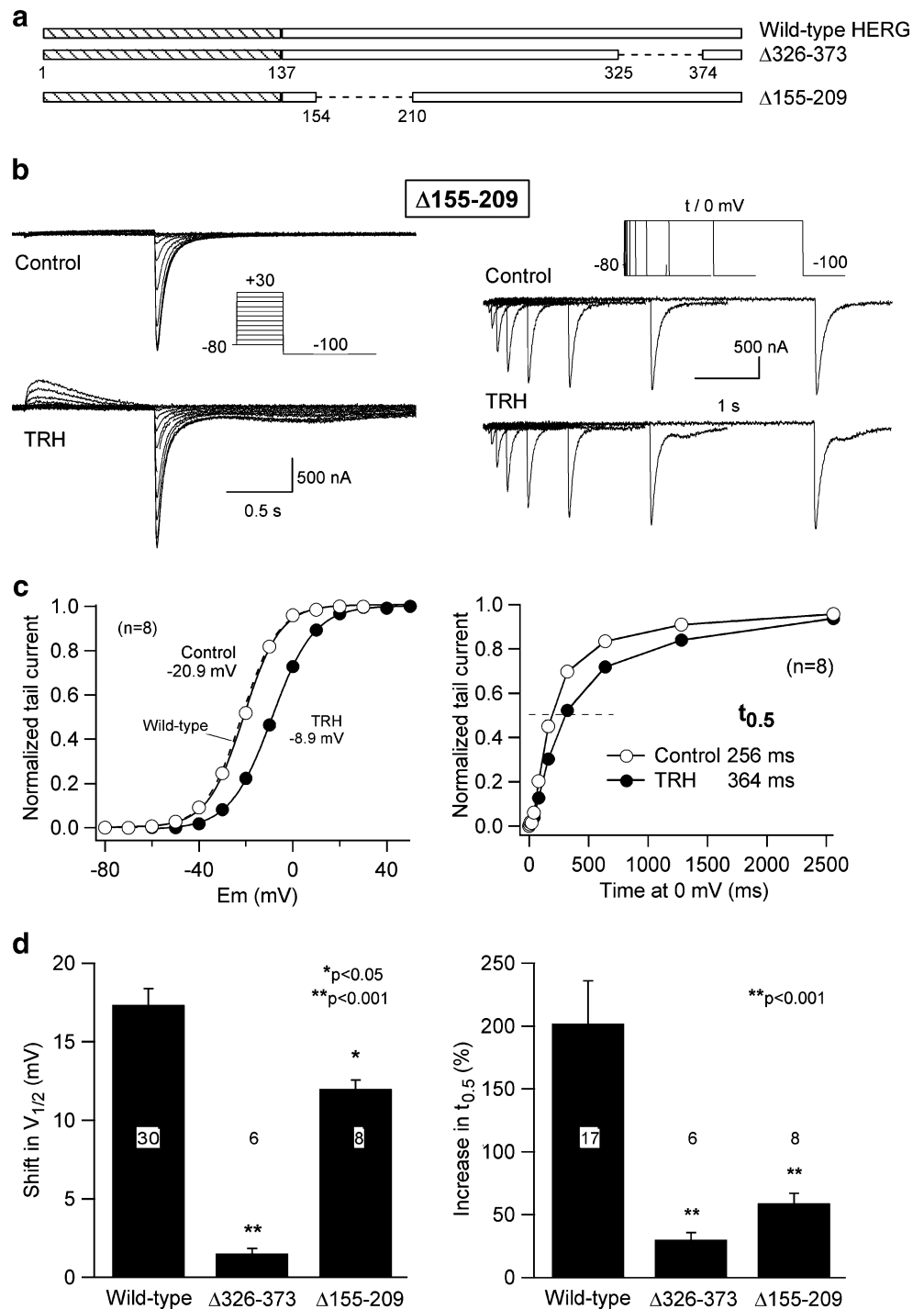
lacking the 16, 41, and 19 residues corresponding to sequences 326–341, 333–373, and 345–373, respectively, and with the absence of hormonal regulation in the constructs from which more than 48 residues are lacking (variants  $\Delta 326-373$  to  $\Delta 138-373$ ; see also [16]). To verify this possibility, we deleted a 55 amino acid region (variant  $\Delta 155-209$ ) similar in size to that of the  $\Delta 326-373$  variant, but located near the amino terminal region of the proximal domain. Analysis of the TRH effects on activation parameters of this new construct demonstrated a significant reduction of the TRH-induced shifts in activation voltage dependence (Fig. 7). Such a reduction of the hormonal effect was even more prominent regarding the slowing down of the activation at 0 mV. Interestingly, the impairment of the hormonal regulatory effects was observed in spite of the fact that the

activation properties of the  $\Delta 155-209$  mutant remained the same as those of the wild-type channels. This suggests that the lack of hormonal effects in channels lacking segments 326–373 (or with bigger deletions) is not due to alterations in the activation properties induced by the deletions. It, therefore, supports the interpretation that the effect of the longer deletions is due to structural alteration(s) in the cytoplasmic domain(s) leading to a diminished ability to modulate the gating machinery located in the transmembrane channel core.

Elimination of the TRH-induced modifications in activation by mutations in the S4–S5 linker

As indicated above, our data suggest that maintenance of a global structure relatively unaltered in the amino terminal

**Fig. 7** Effect of TRH on activation properties of the HERG channel construct  $\Delta 155-209$  with a 55 amino acid deletion in the proximal domain. **a** Schematic diagram of HERG amino terminus in wild-type,  $\Delta 326-373$ , and  $\Delta 155-209$  HERG channels. **b** Effect of TRH on  $\Delta 155-209$  channel currents in response to the indicated voltage protocols for studying the activation voltage dependence (*left*) and the activation time course at 0 mV (*right*). **c** Effect of TRH on activation voltage dependence (*left*) and the time course of activation at 0 mV (*right*) of  $\Delta 155-209$  channels. A Boltzmann curve obtained without TRH from oocytes expressing wild-type channels (*dashed line*) is also shown for comparison. **d** Comparison of TRH-induced effects on activation voltage dependence shifts and increases in  $t_{0.5}$  values of  $\Delta 155-209$  channels. Data for wild-type and  $\Delta 326-373$  channels are also included for comparison

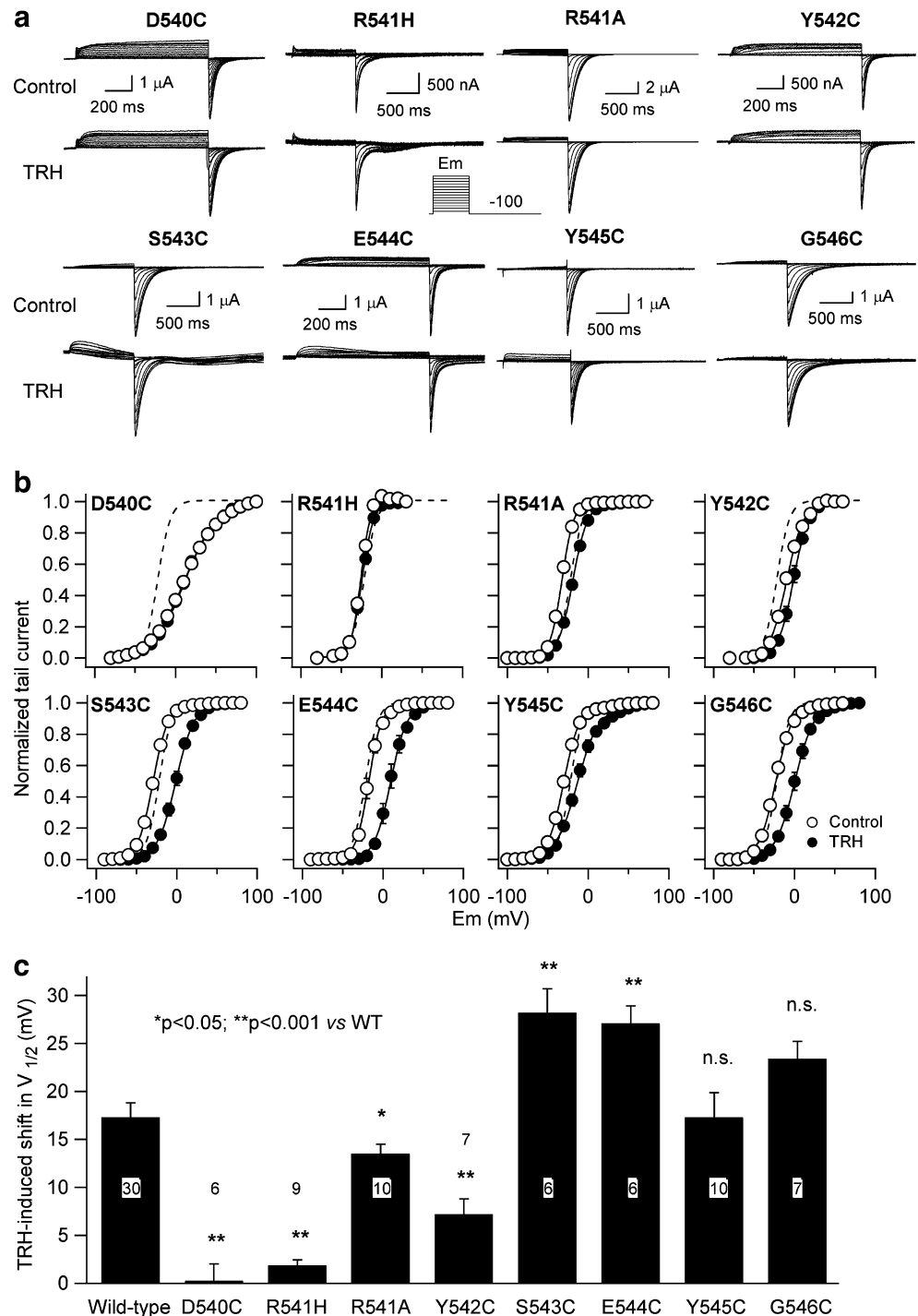


domains is important for the regulatory effects triggered by TRH. This would explain the lack of hormonal effects once the structure and/or the correct positioning of one or more of these domains toward the channel and/or its gating machinery is altered. The intracellular region that links HERG transmembrane domains S4 and S5 has been proposed as a docking site for the N-terminal region and also as a possible linker between S4 movement and channel opening or as a part of the activation gate itself [34, 44].

Also, data from our laboratory suggested that the interaction between amino terminal structures and the S4-S5 linker (amino acids 540 to 546) may act as a determinant of changes in activation parameters caused by deletion of proximal domain segments [1]. This prompted us to check whether the modulatory effects of TRH on activation parameters can also be altered by structural modifications in the S4-S5 linker. As shown in Fig. 8, the TRH-induced shifts in activation voltage dependence are strongly reduced



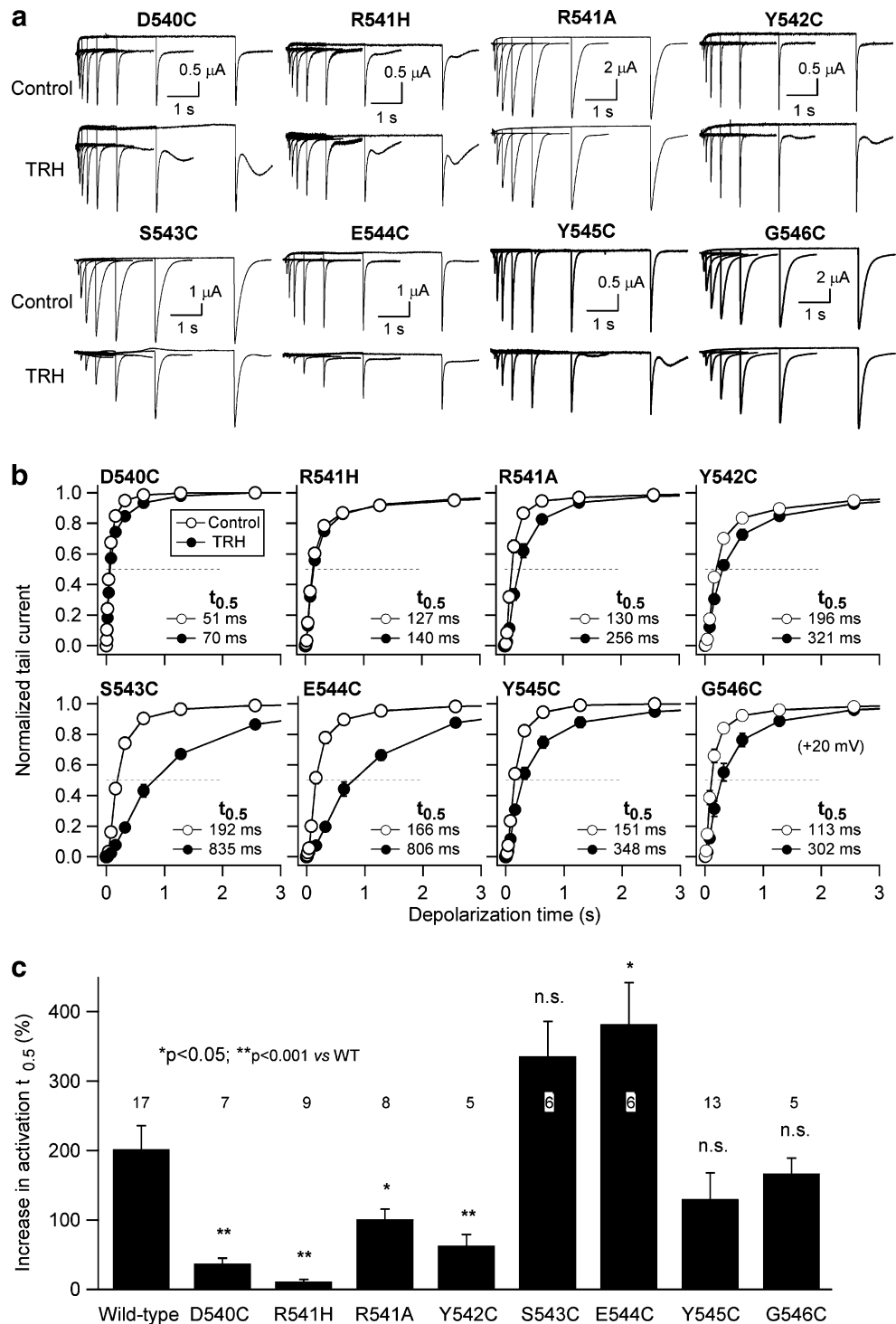
**Fig. 8** Effect of TRH on activation voltage dependence of HERG channels carrying single-point mutations in the S4–S5 linker. **a** Membrane currents from oocytes expressing the indicated channel mutants are shown. Families of currents correspond to individual representative oocytes in the absence (*top panels*) or the presence of 1  $\mu$ M TRH (*bottom panels*) using the voltage protocol shown in the *inset*. Oocytes bathed in high- $K^+$  medium were used for recordings. Note the enhanced time scale in the D540C, Y542C, and E544C mutant panels for a better view of the fast deactivating tails exhibited by these channels. **b** Averaged *I/V* curves for the number of oocytes indicated in **c**. Boltzmann curves obtained without TRH from oocytes expressing wild-type channels (*dashed lines*) are also shown. **c** Comparison of TRH-induced *I/V* shifts on channels with different single-point mutations in the S4–S5 linker



in channels with the single-point mutations D540C, R541H, and Y542C. A sizeable but significantly smaller shift was also observed in the R541A mutant. However, the TRH-induced alteration of activation voltage dependence remained the same (or was even increased) when the amino acids located in the carboxy terminal portion of the S4–S5 linker (residues 543, 544, 545, and 546) were substituted with cysteines. Analogous results were obtained when the TRH effect on activation was tested during a time course.

Thus, the slowing of activation triggered by the hormone was also minimized by the mutations D540C, R541H, R541A, and Y542C, but not by the S543C, E544C, Y545C, and G546C mutants (Fig. 9). It is important to emphasize that the reduction of the hormonal effects was similarly observed both in the D540C mutant (showing an activation voltage dependence relatively shifted to positive values and less steep *I/V* curves; see [1]) and in the R541H and Y542C mutants showing similar activation properties to those of

**Fig. 9** Effect of TRH on activation time course of HERG channels with single-point mutations in the S4–S5 linker. **a** Membrane currents from oocytes expressing the indicated channel mutants. Families of currents correspond to individual representative oocytes in the absence (*top*) or the presence of 1  $\mu$ M TRH (*bottom*) using a voltage protocol identical to that depicted in Figs. 2 and 6. A depolarizing voltage of 0 mV was used except for the G546C mutant for which data were obtained at +20 mV due to its slightly slowed activation kinetics. In all cases, a repolarizing potential of  $-100$  mV was used. **b** Activation time courses of the different mutants. Averaged data normalized to maximum are shown. The time necessary to reach a half-maximal tail current magnitude (*dashed lines*) with (*solid symbols*) and without TRH (*open symbols*) is indicated in the graphs. The scale of the x axes has been limited to 3 s for a better view of the differences in the activation time course after adding TRH. **c** Comparison of TRH effects on activation time courses of channels mutated in the S4–S5 linker. One hundred percent increase corresponds to a doubled  $t_{0.5}$  value



wild-type channels. This indicates that impairment of the TRH-induced effects is specifically due to the disabling of the regulatory mechanism and not to a previous alteration of the activation gating process as a consequence of the mutation itself. On the other hand, it also identifies the initial amino terminal portion of the S4–S5 linker as a crucial point for transmission of the regulatory message to the gating machinery.

It is important to note that the bulk of constructs used in this study to map the influence of amino terminal structural alterations on activation parameters have been designed to cover the second half of the proximal domain, previously proposed to be involved in hormonal modulation of HERG activation [16]. However, consistent with our previous data showing a maintained effect of the hormone on deactivation of channels lacking almost half of the proximal domain

(residues 284 to 373, ref. [16]), a normal acceleration of closing rates equivalent to that obtained with wild-type HERG was observed with most of the constructs used in this study (Supplementary Fig. 1). Note also that although a clear impairment of the TRH effect on closing was observed with channel variants either deleted in the initial *eag*/PAS domain ( $\Delta 2-135$ ) or carrying single-point mutations in the amino half of the S4–S5 loop (e.g., D540 and R541 residues), a clear interpretation of these data is complicated by the strong modification of closing rates induced by the mutations themselves (Supplementary Fig. 1 and ref. [1]).

## Discussion

A distinctive structural signature of HERG channels that differentiates them from the rest of voltage-dependent potassium channels is the presence of a long stretch of amino acids in the amino terminus (the proximal domain) that separates the initial *eag* domain (conserved in members of the *eag* channel subfamily) from the first transmembrane helix S1 [42, 45]. Our previous studies using HERG-deleted variants indicated that elimination of the proximal domain induces kinetic alterations that favor channel activation [15, 42]. More recent work using the aforementioned channel variants suggested that the proximal domain, particularly the sequence corresponding to residues 326–345, constituted a crucial component for TRH-induced modulation of HERG activation in oocytes coexpressing TRH receptors and HERG channels [16]. In an attempt to further delimit the molecular determinants of the hormonal effects, we generated a HERG variant from which residues 333–373 were deleted. Due to the fact that normal TRH-induced responses are obtained with this variant but that a complete elimination of the hormonal effects is achieved by increasing the size of the deletion by few additional residues (variant  $\Delta 326-373$ ), we initially interpreted that the short sequence extending from residues 326 to 332 was required for the hormonal regulation of HERG activation to take place. The amino acid composition of this sequence was especially appealing since it included several consensus sites for phosphorylation by different protein kinases and for interaction with regulatory components such as 14-3-3 proteins and inositol phospholipids, all of them recently proposed as putative regulators of ERG currents [6, 7, 19, 23, 46]. Surprisingly, introduction of single-point mutations (either individually or combined) in the phosphorylation sites of the 326–332 sequence and changing the two arginine residues included in this sequence to alanines did not alter the TRH-induced effects on activation voltage dependence and activation rates. This suggests that the impairment of the hormonal effects caused by extending the size of the deletions from residue 333 to amino acid 326

was not due to the elimination of the consensus sites, but it is probably related to the deletion itself and/or to a structural disruption of the cytoplasmic domains. An additional demonstration that this is the case is provided by channel variants carrying (1) a short deletion that includes the 326–332 sequence and its surroundings or (2) a short stretch of amino acids replacing the sequence contained between residues 326 and 341 by a different sequence unrelated to HERG. In all cases, these structural modifications do not significantly modify the TRH-induced modifications of HERG activation voltage dependence and activation rates.

The demonstration that the amino acid sequence corresponding to positions 326–332 does not determine by itself the hormonal regulatory effects opens up the possibility that the lack of hormonal effects in channels without the segment 326–373 (or having longer deletions) is due to the alteration(s) in activation behavior caused by the deletions themselves. This would be coherent with the absence of TRH effects in variants  $\Delta 284-373$ ,  $\Delta 223-373$ , and  $\Delta 138-373$  showing a very accelerated activation and a strong shift in the *I/V* curves to the left [16] and also with the fact that a normal TRH-induced regulation is obtained with  $\Delta 333-373$  channels with a slightly slower activation and a certain displacement of the *I/V* curve to more depolarized values. However, a normal TRH-induced regulation is observed in  $\Delta 345-373$  and  $\Delta 355-373$  channels in which clear accelerations of activation rates and hyperpolarizing shifts are induced by the deletions. Additionally,  $\Delta 155-209$  channels display activation properties analogous to those of wild-type HERG, but show a significant impairment of the hormonal effects. Finally, the hormonal regulation is virtually abolished in single-point mutants of the S4–S5 linker that do not show the altered activation kinetics encountered in the proximal domain-deleted mutants. All these data together mean that no correlation exists between the alterations in activation induced by a given mutation and its ability to impair the TRH-induced regulation.

Alternatively, it could be possible that the structural modifications introduced in the channel variants showing a reduced hormonal response could cause a destabilization of some cytoplasmic domain(s) and/or their misalignment toward the channel-gating machinery. This possibility is supported by the results obtained with variant  $\Delta 155-209$  which has a deletion equivalent in size to that of the  $\Delta 326-373$  construct but located in the amino terminal portion of the proximal domain. Even though the hormonal regulation was not impaired to the same extent as in the  $\Delta 326-373$  channels, a significant reduction of the TRH-induced effects was induced by the  $\Delta 155-209$  deletion. Remarkably, the hormonal effect remained unaltered in channels from which the initial 135 amino acids (including the *eag*/

PAS, ref. [26]) had been eliminated. This indicates that it is the amino terminal proximal domain but not the *eag*/PAS region which is important for the TRH effects on HERG activation. It is also worth noting that the modulatory effects triggered by the hormone were not impaired in channels carrying an altered (or absent) KIKER sequence between residues 362 and 367. This demonstrates that, in spite of the crucial role of this charged amino acid cluster in setting the basal HERG activation phenotype [32], it does not seem to be involved in the hormonal modulation of activation parameters by TRH. Further work will be necessary to identify the cytoplasmic structure(s) involved in the transmission of the TRH effects to the HERG-gating machinery.

Previous work with HERG and other channels indicated that the S4–S5 linker could play a crucial role in the coupling of the voltage-sensing machinery to channel activation [40]. This concept has been recently strengthened by structural evidence in a *Shaker* family K<sup>+</sup> channel [24]. It is also known that the S4–S5 linker acts as docking site for regulation of HERG deactivation gating by amino terminal domains [15, 26, 34, 44]. Our recent results also suggest that an interaction between the amino terminus and the S4–S5 linker may contribute to HERG-gating alterations induced by amino terminal deletions [1] or extracellular acidification (Alonso-Ron et al., manuscript in preparation). The results reported in this study demonstrate that the hormonal effects are strongly impaired by single-point mutations in the amino terminal portion of the S4–S5 linker. Interestingly, this is observed not only with mutants showing a relatively strong alteration of their activation parameters (e.g., D540C channels), but also with channels carrying much more conservative mutations (e.g., R541H) in which activation properties similar to those of wild-type channels were obtained. Altogether, this suggests that, not only is a correct structural organization of the amino terminal domains required, but also an appropriate arrangement of these domains toward the central channel body is critical for hormonal modulation of HERG activation properties. Furthermore, it identifies the initial portion of the S4–S5 linker as a key point for transmission of the regulatory actions triggered by the activation of PLC-coupled receptors from the cytoplasmic domains to the HERG channel core.

**Acknowledgements** This work was supported by grants SAF2003-00329 from the Ministerio de Ciencia y Tecnología, BFU2006-10936 from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain (both partially cofinanced by FEDER European Funds) and IB05-002 from the Principado de Asturias (Spain). C.A.R. and D.G.M. are predoctoral fellows from the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología (refs. BES-2004-3872 and AP2000-4363). P.M. holds a predoctoral fellowship from FICYT of Asturias (ref. BP03-108).

## References

- 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
- Barros F, Villalobos C, García-Sancho J, del Camino D, de la Peña P (1994) The role of the inwardly rectifying K<sup>+</sup> current in resting potential and thyrotropin-releasing hormone-induced changes in cell excitability of GH3 rat anterior pituitary cells. *Pflügers Arch* 426:221–230
- Barros F, del Camino D, Pardo LA, Palomero T, Giráldez T, de la Peña P (1997) Demonstration of an inwardly rectifying K<sup>+</sup> current component modulated by thyrotropin-releasing hormone and caffeine in GH3 rat anterior pituitary cells. *Pflügers Arch* 435:119–129
- Barros F, Gómez-Varela D, Vilorio CG, Palomero T, Giráldez T, de la Peña P (1998) Modulation of human erg K<sup>+</sup> channel gating by activation of a G protein-coupled receptor and protein kinase C. *J Physiol (Lond)* 511:333–346
- Bauer CK, Schäfer R, Schiemann D, Reid G, Hanganu I, Schwarz JR (1999) A functional role of the erg-like inward-rectifying K<sup>+</sup> current in prolactin secretion from rat lactotrophs. *Mol Cell Endocrinol* 148:37–45
- Bian J, Cui J, McDonald TV (2001) HERG K<sup>+</sup> channel activity is regulated by changes in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Circ Res* 89:1168–1176
- Cayabyab FS, Schlichter LC (2002) Regulation of an ERG K<sup>+</sup> current by Src tyrosine kinase. *J Biol Chem* 277:13673–13681
- Cherubini A, Taddei GL, Crociani O, Paglierani M, Buccoliero AM, Fontana L, Noci I, Borri P, Borroni E, Giachi M, Becchetti A, Rosati B, Wanke E, Olivetto 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
- Chiang C, Roden DM (2000) The long QT syndromes: genetic basis and clinical implications. *J Am Coll Cardiol* 36:1–12
- de la Peña P, Delgado LM, del Camino D, Barros F (1992) Cloning and expression of the thyrotropin-releasing hormone receptor from GH<sub>3</sub> rat anterior pituitary cells. *Biochem J* 284:891–899
- de la Peña P, Delgado L, 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
- de la Peña P, del Camino D, Pardo LA, Domínguez P, Barros F (1995) Gs couples thyrotropin-releasing hormone receptors expressed in *Xenopus* oocytes to phospholipase C. *J Biol Chem* 270:3554–3559
- Emmi A, Wenzel HJ, Schwartzkroin PA, Tagliatalata M, Castaldo P, Bianchi L, Nerbonne J, Robertson GA, Janigro D (2000) Do glia have heart? Expression and functional role for Ether-a-go-go currents in hippocampal astrocytes. *J Neurosci* 20:3915–3925
- Finlayson K, Witchel HJ, McCulloch J, Sharkey J (2004) Acquired QT interval prolongation and HERG: implications for drug discovery and development. *Eur J Pharmacol* 500:129–142
- 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<sup>+</sup> channels. *J Membr Biol* 187:117–133
- Gómez-Varela D, Barros F, Vilorio CG, Giráldez T, Manso DG, Dupuy SG, 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* 535:125–130

17. 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 r-ERG current reduction in GH<sub>3</sub> rat anterior pituitary cells. *J Physiol (Lond)* 547:913–929
18. Jian M, Dun W, Fan J-S, Tseng G-N (1999) Use-dependent 'agonist' effect of azimilide on the HERG channel. *J Pharmacol Exp Ther* 291:1324–1336
19. Kagan A, Melman YF, Krumerman A, McDonald TV (2002) 14-3-3 amplifies and prolongs adrenergic stimulation of HERG K<sup>+</sup> channel activity. *EMBO J* 8:1889–1898
20. Keating MT, Sanguinetti MC (2001) Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias. *Cell* 104:569–580
21. Kemp BE, Pearson RB (1990) Protein kinase recognition sequence motifs. *Trends Biochem Sci* 15:342–346
22. Kennelly PJ, Krebs EG (1991) Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J Biol Chem* 266:15555–15558
23. Kiehn J (2000) Regulation of the cardiac repolarizing HERG potassium channel by protein kinase A. *Trends Cardiovasc Med* 10:205–209
24. Long SB, Campbell EB, MacKinnon R (2005) Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science* 309:903–908
25. Miranda P, Giráldez T, de la Peña P, Manso DG, Alonso-Ron C, Gómez-Varela D, Domínguez P, Barros F (2005) Specificity of TRH receptor coupling to G-proteins for regulation of ERG K<sup>+</sup> channels in GH<sub>3</sub> rat anterior pituitary cells. *J Physiol (Lond)* 566:717–736
26. 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
27. Morita H, Wu J, Zipes DP (2008) The QT syndromes: long and short. *Lancet* 372:750–763
28. Overholt JL, Ficker E, Yang T, Shams H, Bright GR, Prabhakar NR (2000) HERG-like potassium current regulates the resting membrane potential in glomus cells of the rabbit carotid body. *J Neurophysiol* 83:1150–1157
29. Redfern WS, Carlsson L, Davis AS, Lynch WG, MacKenzie I, Palethorpe S, Siegl PKS, Strang I, Sullivan AT, Wallis R, Camm AJ, Hammond TG (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
30. 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
31. 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<sup>+</sup> channels in firing and release. *FASEB J* 14:2601–2610
32. 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
33. Sanguinetti MC, Jiang C, Curran ME, Keating MT (1995) A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG channel encodes the I<sub>Kr</sub> potassium channel. *Cell* 81:299–307
34. Sanguinetti MC, Xu QP (1999) Mutations of the S4–S5 linker alter activation properties of HERG potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol (Lond)* 514:667–675
35. Schäfer R, Wulfsen I, Behrens S, Weinsberg F, Bauer CK, Schwarz JR (1999) The erg-like current in rat lactotrophs. *J Physiol (Lond)* 518:401–416
36. Schledermann W, Wulfsen I, Schwarz JR, Bauer CK (2001) Modulation of rat erg1, erg2, erg3 and HERG K<sup>+</sup> currents by thyrotropin-releasing hormone in anterior pituitary cells via the native signal cascade. *J Physiol (Lond)* 532:143–163
37. Schwartz PJ (2005) Management of long QT syndrome. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2:346–351
38. Thomas D, Zhang W, Wu K, Wimmer A-B, Gut B, Wendt-Nordahl G, Kathöfer S, Kreye VAW, Katus HA, Schoels W, Kiehn J, Karle CA (2003) Regulation of potassium channel activation by protein kinase C independent of direct phosphorylation of the channel protein. *Cardiovasc Res* 59:14–26
39. Thomas D, Kiehn J, Katus HA, Karle CA (2004) Adrenergic regulation of the rapid component of the cardiac delayed rectifier potassium current, I<sub>Kr</sub>, and the underlying hERG ion channel. *Basic Res Cardiol* 99:279–287
40. Tristani-Firouzi M, Chen J, Sanguinetti MC (2002) Interactions between S4–S5 linker and S6 transmembrane domain modulate gating of HERG K<sup>+</sup> channels. *J Biol Chem* 277:18994–19000
41. 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
42. Vilorio 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<sup>+</sup> channel gating. *Biophys J* 79:231–246
43. Viskin S (1999) Long QT syndromes and torsade de pointes. *Lancet* 354:1625–1633
44. 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
45. Warmke JW, Ganetzky B (1994) A family of potassium channel genes related to  *eag*  in *Drosophila* and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:3438–3442
46. Zhang Y, Wang H, Wang J, Han H, Nattel S, Wang Z (2003) Normal function of HERG K<sup>+</sup> channels expressed in HEK293 cells requires basal protein kinase B activity. *FEBS Lett* 534:125–132

# 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\*<sup>[5]</sup>

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<sup>1</sup>, Carlos Alonso-Ron<sup>2</sup>, Angeles Machín<sup>3</sup>, Jorge Fernández-Trillo<sup>4</sup>, Luis Carretero<sup>4</sup>, 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<sup>5</sup>; 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.

<sup>[5]</sup> The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Fig. 1.

<sup>1</sup> 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](mailto:pdelapena@uniovi.es).

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

<sup>3</sup> Supported by a postdoctoral contract from Spanish Ion Channel Initiative Consolider 2008.

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

<sup>5</sup> The abbreviations used are: hERG, human *ether-à-go-go*-related gene; cNBD, cyclic nucleotide-binding domain; T<sub>B</sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *tert*-butyl hydroperoxide.

## hERG N-terminal Interactions with the S4-S5 Linker

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<sub>2</sub>; 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<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 10 mM HEPES, pH 7.4) for 2–3 days as described (1, 2).

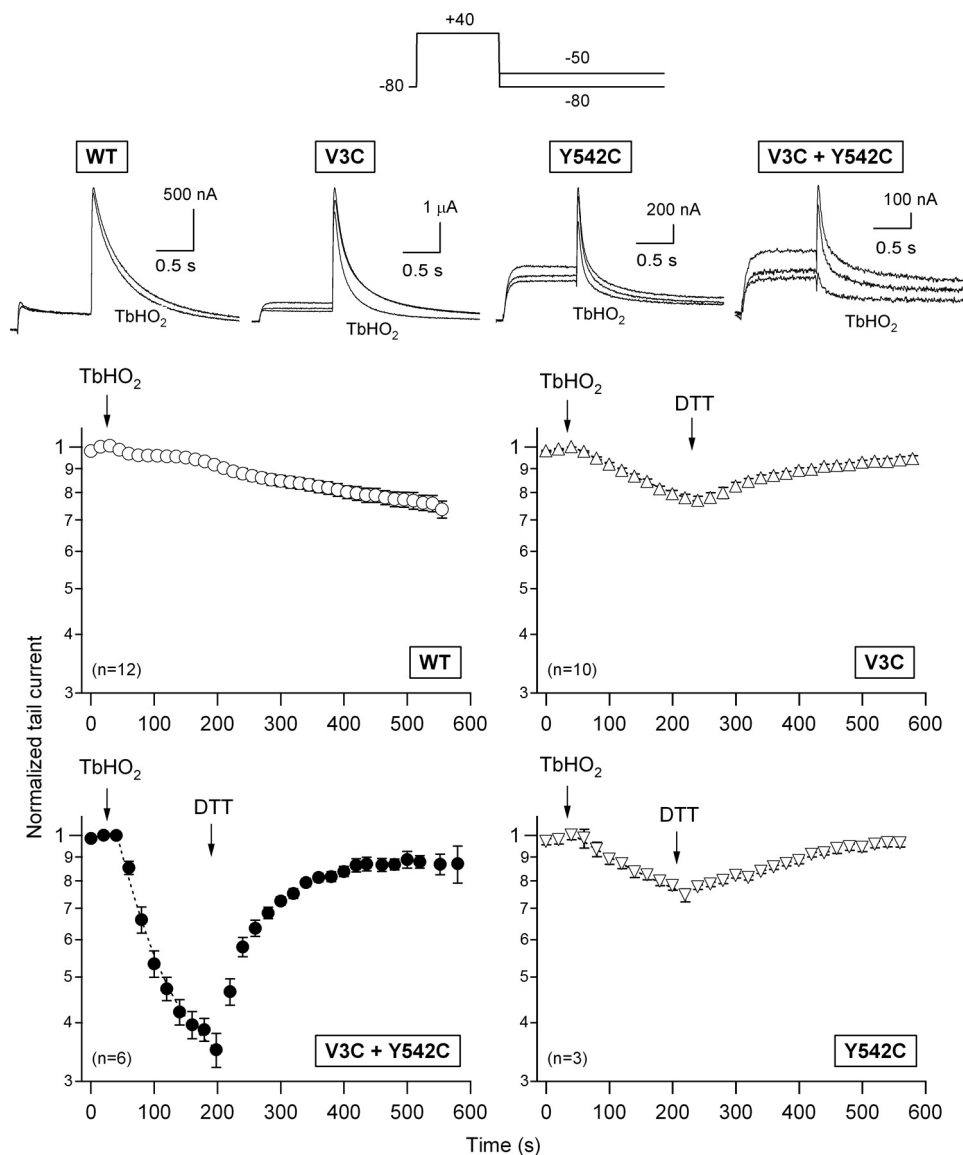
**Electrophysiology**—hERG currents were measured in manually defolliculated oocytes with the two-electrode voltage-clamp method as described previously (1, 2, 24, 26). Unless stated otherwise, recordings were obtained in OR-2 medium. Exceptionally (*e.g.* for the P2C/Y542C construct) high-K<sup>+</sup> 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 *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<sub>2</sub> to oocytes expressing the constructs to



**FIGURE 1. Effect of extracellularly applied  $\text{TbHO}_2$  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  $\text{TbHO}_2$  and 5 mM DTT were applied as indicated. The time course of peak tail current variation was followed for  $\sim 10$  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  $\pm$  S.E. of current magnitudes normalized to the value obtained immediately before  $\text{TbHO}_2$  addition. Monoexponential fits are shown superimposed on the data during the  $\text{TbHO}_2$  treatment. Superposition of two (WT) or three (mutants) current sweeps before, 3 min after application of  $\text{TbHO}_2$ , and 5 min after the addition of DTT are shown in the insets. The lower trace always corresponds to  $\text{TbHO}_2$  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  $\text{TbHO}_2$  (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  $\text{TbHO}_2$ -induced inhibition of the hERG tail current (from a normalized  $I_{\text{tail}}$  decrease of  $5.9 \pm 1.5\%$  ( $n = 12$ ) in the WT to  $21.2 \pm 1.6\%$  ( $n = 10$ ) in V3C channels following a 3-min  $\text{TbHO}_2$  treatment;  $p < 0.001$ ). A similar effect was obtained in response to  $\text{TbHO}_2$  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  $25.4 \pm 3.0\%$  ( $n = 3$ ;  $p < 0.001$  versus the WT). The evolution of these effects was slow, with estimated time constants of  $318 \pm 22$  and  $220 \pm 44$  s for the V3C



## hERG N-terminal Interactions with the S4-S5 Linker

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  $\text{TbHO}_2$ . Thus, an inhibition time constant of  $57.5 \pm 2.8$  s ( $n = 6$ ) was observed, and the  $I_{\text{tail}}$  decrease amounted to  $65 \pm 2.9\%$  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  $\text{TbHO}_2$  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  $\text{TbHO}_2$ -induced reduction of the V3C/Y542C current was rapidly reversed when 5 mM DTT was substituted for the oxidizing agent in the external medium. Thus, a steady-state current level amounting to  $83 \pm 8\%$  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  $\text{TbHO}_2$  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 ( $75 \pm 7\%$  reversal) and Y542C ( $84 \pm 8\%$  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  $172 \pm 6$  and  $500 \pm 198$  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-

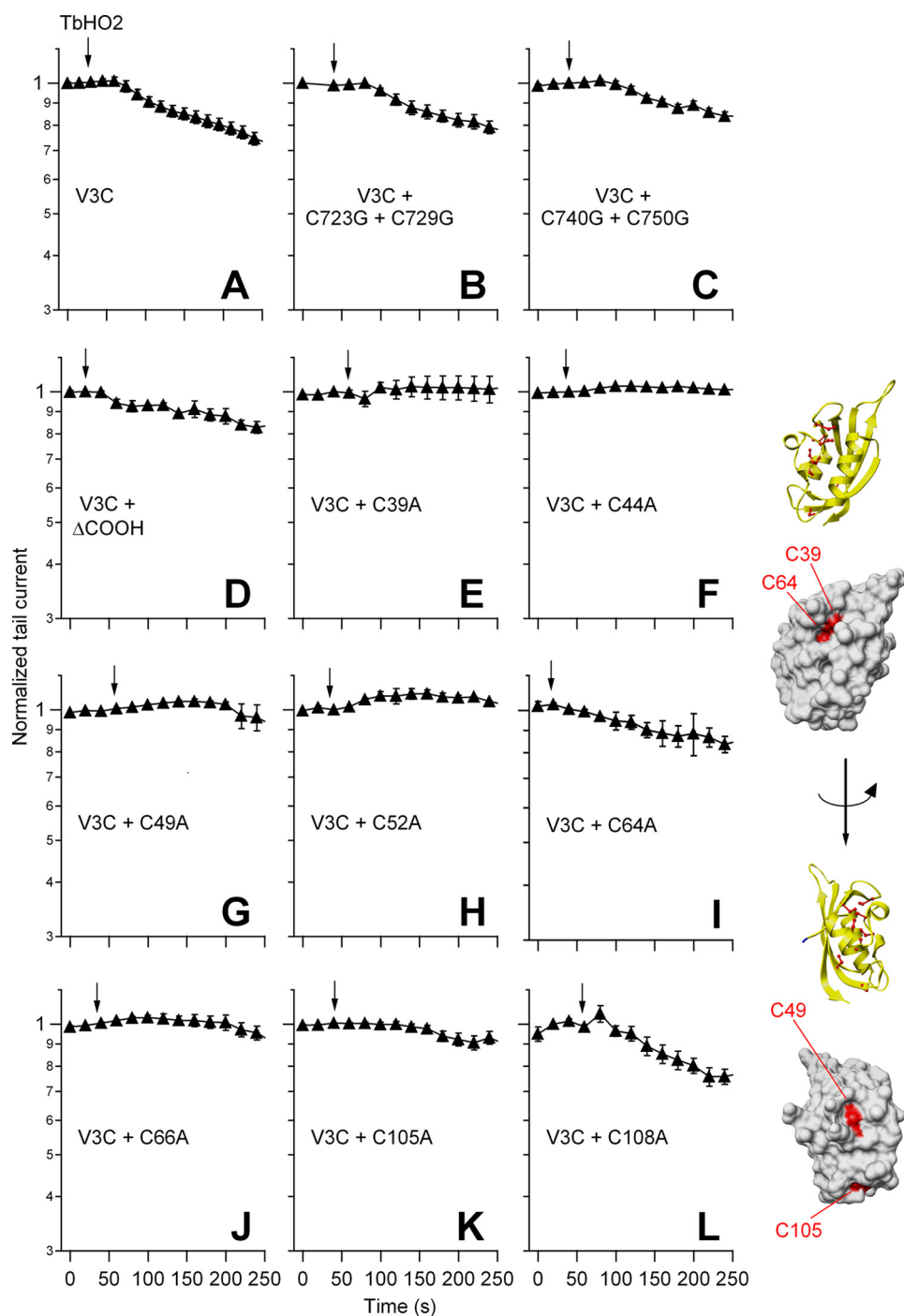
point mutants from which most of the endogenous cysteines present in the intracellular domains of hERG were removed and combined them with the V3C mutation. The effect caused by  $\text{TbHO}_2$ -induced oxidation of these constructs is summarized in Fig. 2.

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  $\text{TbHO}_2$  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  $76.8 \pm 2.0\%$  and  $62.5 \pm 5.6$  s for the V3C/Y542C/C723G/C729G channels ( $n = 4$ ;  $p < 0.05$ ). These values corresponded to  $69.9 \pm 1.9\%$  and  $60 \pm 9.7$  s for V3C/Y542C/C740G/C750G ( $n = 3$ ). Also, DTT largely reversed the oxidation effect in these constructs ( $91 \pm 3.3$  and  $78 \pm 2.1\%$ , respectively). This reversion was also fast, with measured recovery time constants of  $81.2 \pm 11.0$  and  $83.3 \pm 4.6$  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  $\text{TbHO}_2$  on the single-cysteine mutant V3C, we also combined it with a C-terminal deletion (mutant V3C $\Delta$ 864–1010) 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  $\text{TbHO}_2$  to the V3C $\Delta$ 864–1010 construct (Fig. 2, A and D).



**FIGURE 2. Effect of  $\text{TbHO}_2$  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  $\text{TbHO}_2$  (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 (V3C $\Delta$ COOH) 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  $\text{TbHO}_2$ -induced cur-

rent 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

## hERG N-terminal Interactions with the S4-S5 Linker

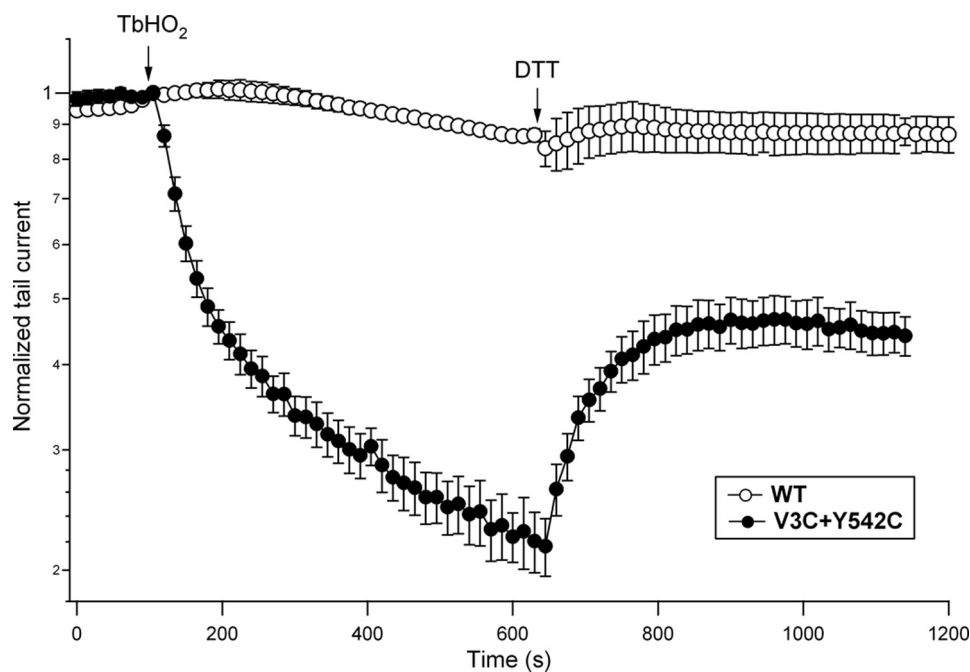


FIGURE 3. **Long-term evolution of the redox effects on hERG currents.** Peak tail currents were recorded from oocytes expressing WT (○) and V3C/Y542C (●) channels as described in the legend to Fig. 1. An extended treatment of ~10 min with 2 mM TbHO<sub>2</sub> was performed, followed by a period of 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<sub>2</sub> addition indicated an apparent slowing of current inhibition at the latter time points of the TbHO<sub>2</sub> treatment (Fig. 1). Prolongation of the oxidizing agent treatment to 10 min more clearly revealed the slowed second phase of the TbHO<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>-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<sub>2</sub>-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.

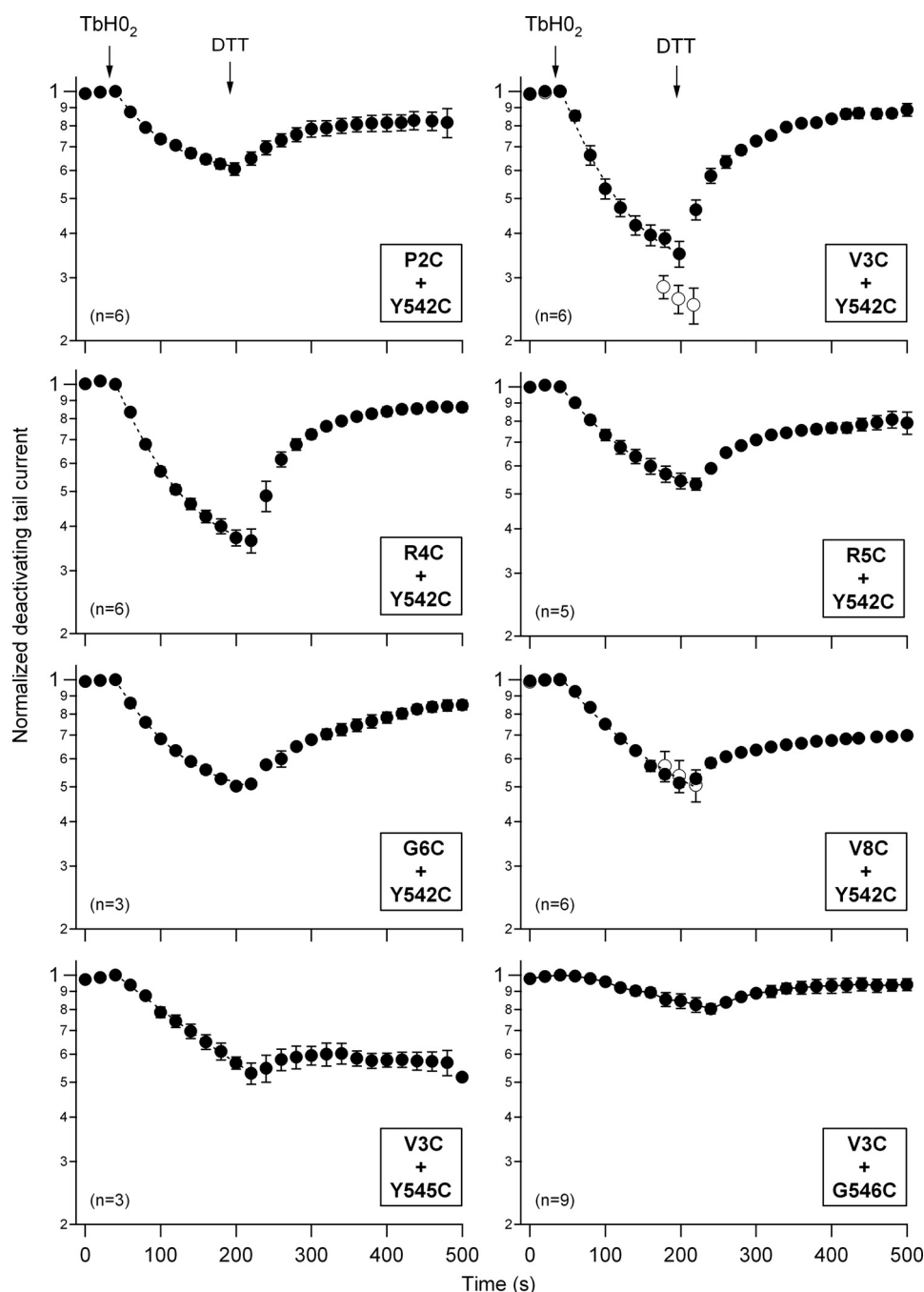


FIGURE 4. **Specificity of the redox effects as a function of the location of double-cysteine mutations.** The time course of the hERG current tail variations was followed upon the addition of 2 mM  $TbHO_2$  and 5 mM DTT as indicated. Oocytes were bathed in standard OR-2 medium, except for the P2C/Y542C 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.  $\circ$  (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

## hERG N-terminal Interactions with the S4-S5 Linker

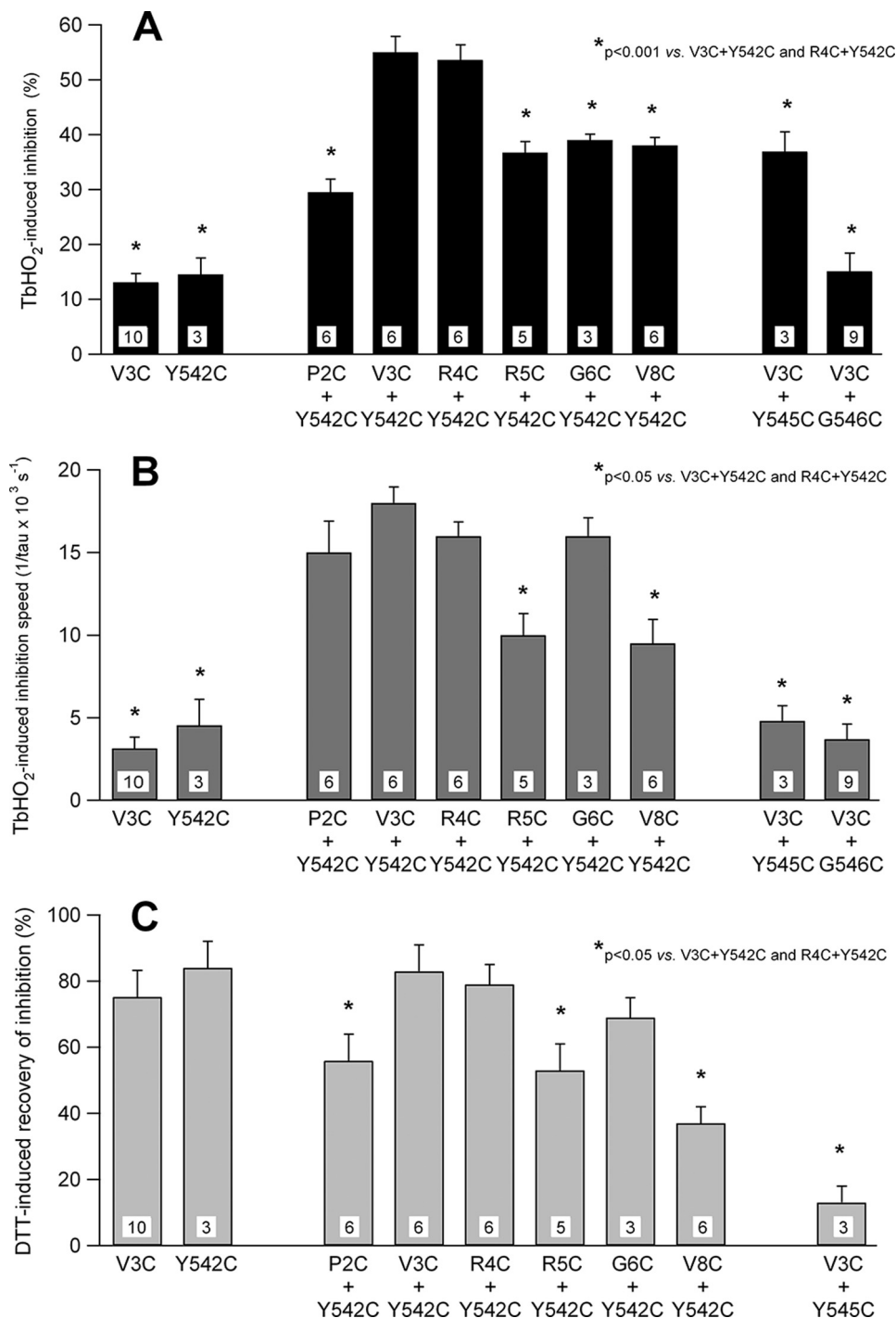


FIGURE 5. Summary of the TbHO<sub>2</sub>- and DTT-induced effects on hERG tail currents. A, quantification of the TbHO<sub>2</sub>-induced inhibition following a 3-min treatment with the oxidizing agent. The 5.9% inhibition measured in the non-mutated WT channels has been subtracted from the data. B, comparison of TbHO<sub>2</sub>-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<sub>2</sub>. 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<sub>2</sub>-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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>.

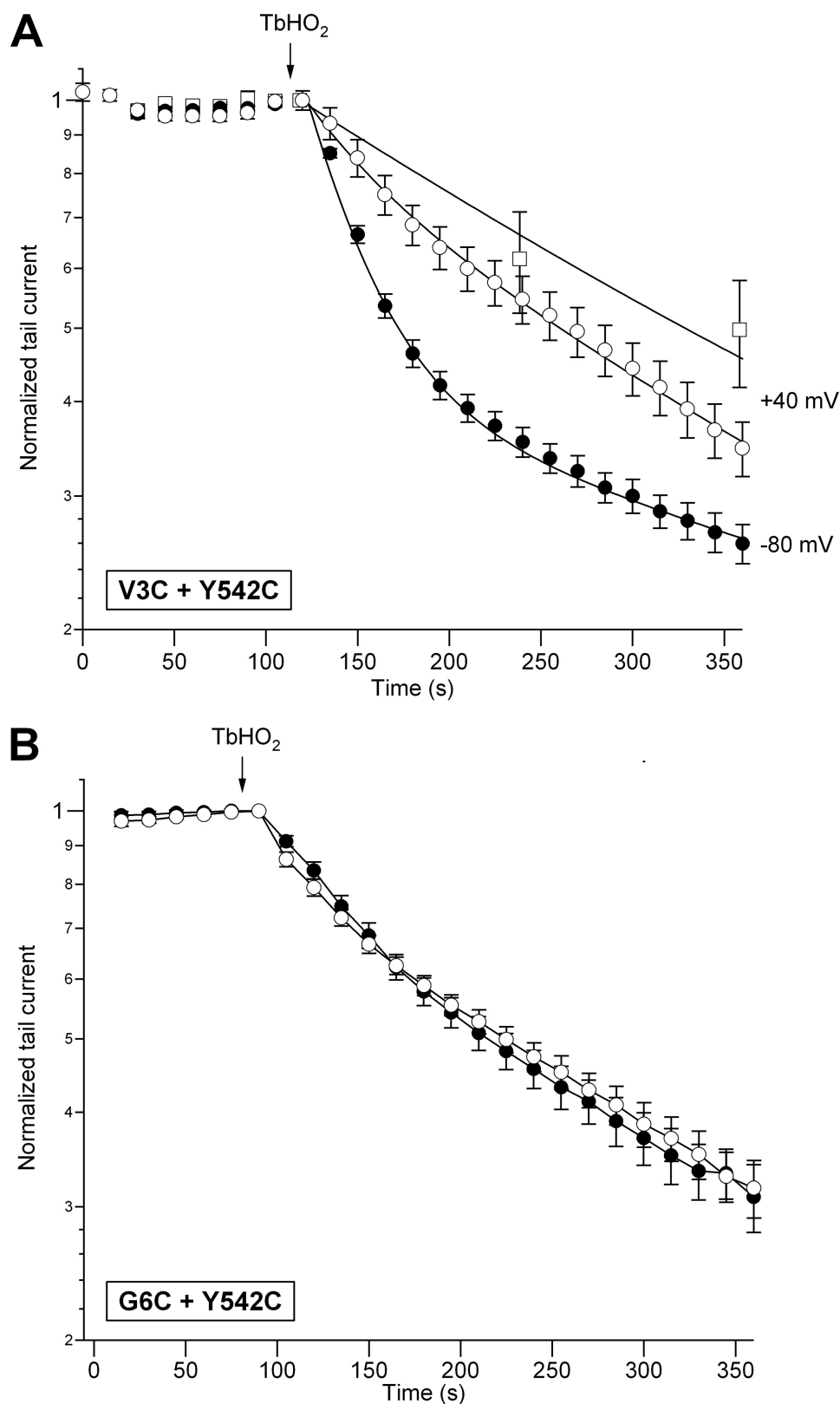


FIGURE 6. **State dependence of the TbHO<sub>2</sub>-induced effect.** *A*, time course of V3C/Y542C peak tail current variation in response to TbHO<sub>2</sub>. Peak tail currents were measured as described in the legend to Fig. 1 during repolarization steps applied at the indicated intervals from holding 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<sub>2</sub>-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<sub>2</sub> 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.

## hERG N-terminal Interactions with the S4-S5 Linker

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  $\Delta G_o$ , 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., Baukowitz, 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. Vioria, 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., Vioria, 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





# Molecular Determinants of Interactions between the N-Terminal Domain and the Transmembrane Core That Modulate hERG K<sup>+</sup> Channel Gating

Jorge Fernández-Trillo<sup>1</sup>, Francisco Barros<sup>1\*</sup>, 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<sup>+</sup> 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 (PdIP)

† 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<sub>Kr</sub> [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 PerArnt-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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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  $\Delta$ 2–135 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  $\Delta$ 2–135 and hERG  $\Delta$ 2–370 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<sub>2</sub> 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  $\mu$ g 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<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 glucose, and 10 HEPES (pH 7.4 with NaOH). The pipette solution contained (in mM): 140 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 0.7 CaCl<sub>2</sub>, 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,  $\tau_f$  and  $\tau_s$  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 $\times$  oil-immersion TIRF objective (1.45 NA; Oil, Alpha Plan Fluor), 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, Bockingham, VT, USA), and two z442/514 $\times$  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 505dxc 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 $\times$ 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 ( $F_{\text{CFP}}$ ) increases in a continuous way during the relatively long YFP photobleaching period. This also precluded the possibility of performing linear regression of  $F_{\text{CFP}}$  recovery versus  $F_{\text{YFP}}$  decrease to extrapolate the  $F_{\text{CFP}}$  values to zero  $F_{\text{YFP}}$  [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  $F_{\text{CFP}}$  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  $F_{\text{CFP}}$  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  $\approx 20\%$ , up to around  $\approx 95\%$  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  $F_{\text{YFP}}/F_{\text{CFP}}$  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 ( $E_{\text{FRET}}$  in %), defined as described previously by the expressions  $E_{\text{FRET}} = E_{\text{FRET}(\text{APP})} \alpha_{\text{D}} \times 100 = [1 - (F_{\text{DA}}/F_{\text{D}})] \alpha_{\text{D}} \times 100$  in which  $F_{\text{DA}}$  and  $F_{\text{D}}$  are the fluorescence intensities of the donor before and after photobleaching of the acceptor, respectively, and  $\alpha_{\text{D}}$  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  $\pm$  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  $\Delta 2$ -370), and also channels in which only the region corresponding to the *eag* domain was deleted (hERG  $\Delta 2$ -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  $\Delta 2$ -370 (N1-135/YFP: hERG  $\Delta 2$ -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  $\Delta 2$ -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  $\Delta 2$ -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  $\Delta 2$ -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  $\Delta 2$ -135 channel remained the same in the presence of N1-135/YFP (Fig. S1 and Table S1). Similar results were obtained with the hERG  $\Delta 2$ -370 channel (Table S1). Therefore, no differences in total potential energy driving deactivation (i.e.,  $-(\Delta G_{o-z_g}EF)$ , 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  $\alpha$ -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  $\Delta 2$ -135/Y542C construct). Almost identical results were obtained with the  $\Delta 2$ -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.

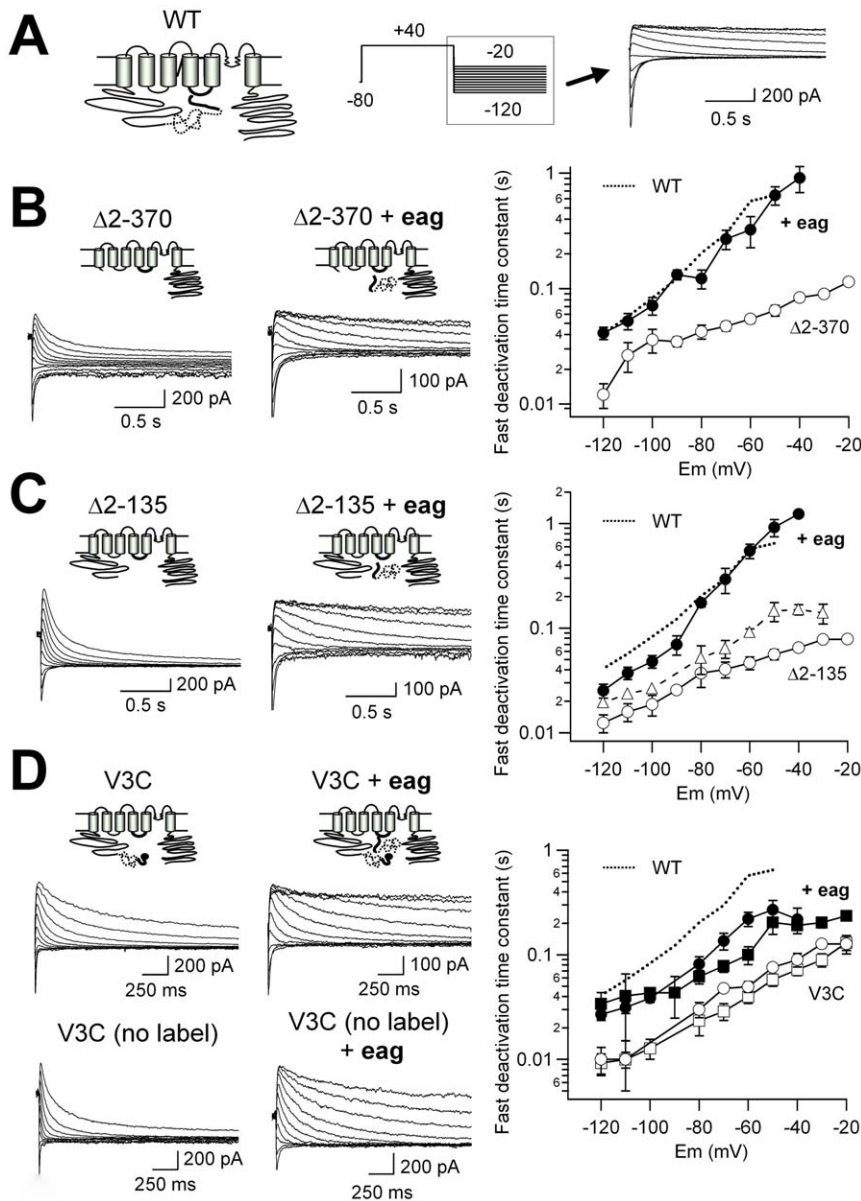
It has been shown previously that introduction of a Gly to Cys mutation at residue 546 of the S4–S5 linker does not accelerate hERG channel closing [25,46]. Also, a Cys at this position is not able to effectively establish a disulfide bond with a second cysteine located at the beginning of the hERG amino terminus [29]. To check the specificity of the Y542C effect, we generated a new channel construct (hERG  $\Delta 2$ -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  $\Delta 2$ -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  $\Delta 2$ -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  $\Delta 2$ -135 channel alone. Finally, the ability of the recombinant fragment to restore slower closing was significantly improved when the hERG  $\Delta 2$ -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  $\Delta 2$ -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

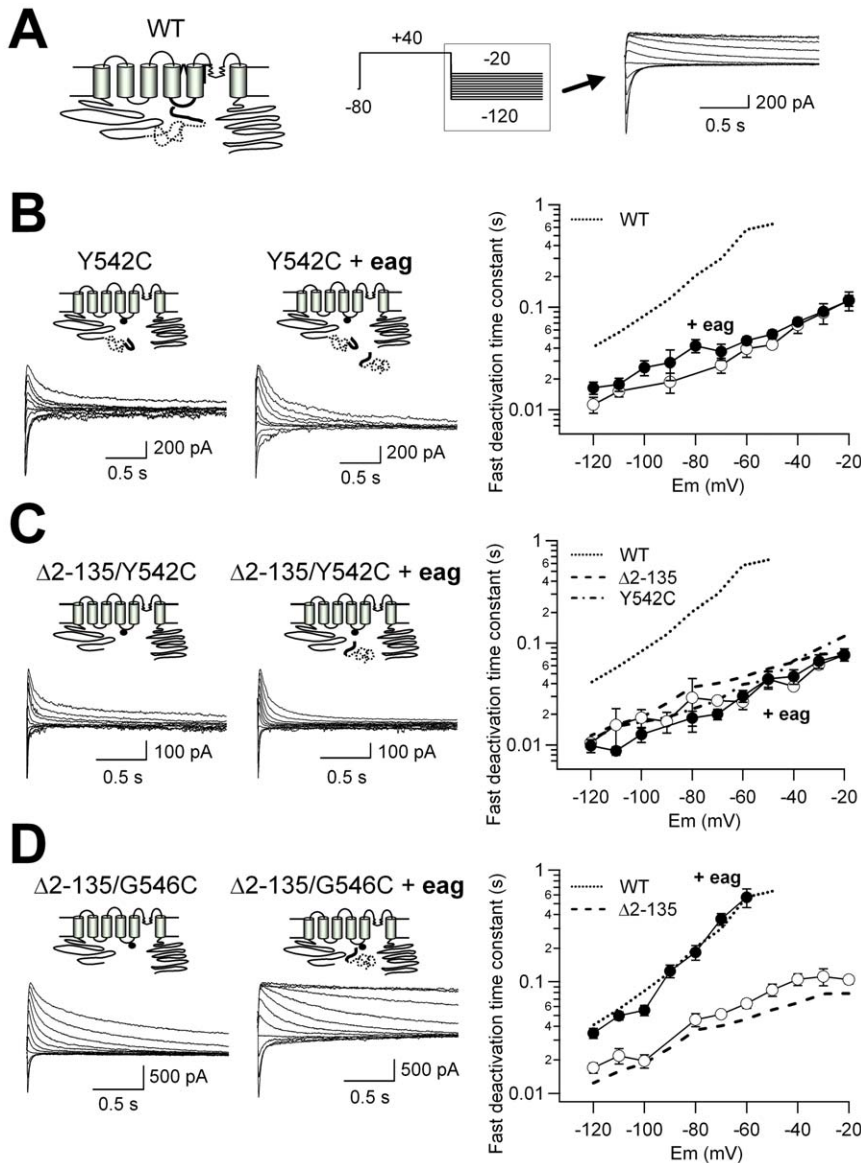
As a direct test for the physical proximity between the recombinant fragments and the hERG channels showing restored



**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<sup>+</sup> 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 ( $\Delta 2-370$ ; panel B), lacking only the *eag* domain ( $\Delta 2-135$ ; 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  $\Delta 2-135$  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

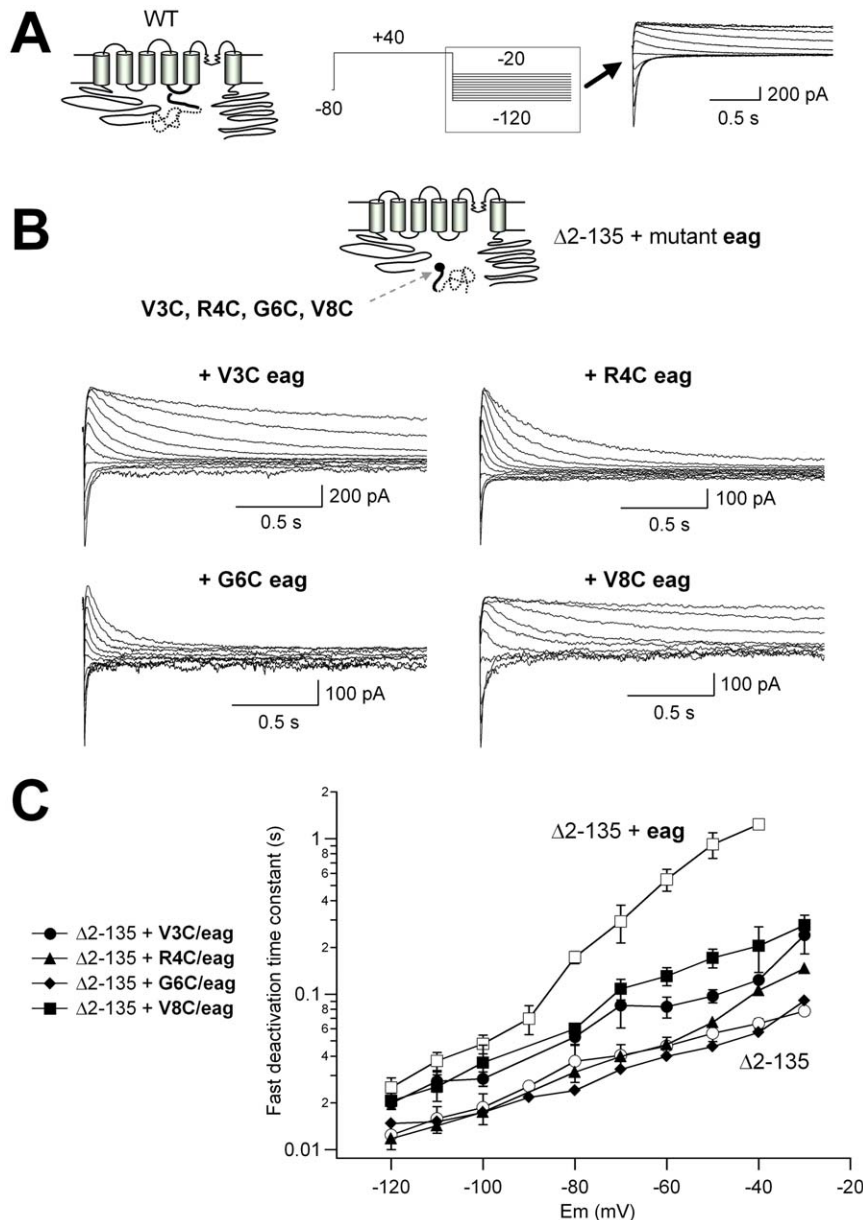


**Figure 2. The recombinant N1-135/YFP fragment does not restore slow deactivation of hERG channels carrying a Y542C mutation in the S4-S5 linker.** **A.** Schematic of the WT hERG K<sup>+</sup> channel and representative tail currents obtained with the indicated protocol are shown for comparison. **B.** 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  $\approx 100$  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  $\Delta 2-135$  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  $\Delta 2-135$  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  $\Delta 2-135$  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  $\Delta 2-135$  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  $E_{\text{FRET}}$  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  $\Delta$ 2-135 carrying CFP at the C-terminus, the level of  $E_{\text{FRET}}$  amounted to  $13.25 \pm 1.05\%$  ( $n = 12$ ; 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  $\Delta$ 2-135 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  $E_{\text{FRET}}$  was observed between N1-135/YFP and wild-type hERG labeled with CFP at the C-terminus ( $0.49 \pm 2.99\%$ ,  $n = 12$ ). 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  $E_{\text{FRET}}$  ( $9.61 \pm 3.8\%$ ,  $n = 13$ ;  $p = 0.36$  vs  $\Delta$ 2-135) 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  $\Delta$ 2-135 channel carried a Y542C mutation at the beginning of the S4–S5 linker (hERG  $\Delta$ 2-135/Y542C, Fig. 5A). By contrast, a FRET signal ( $12.5 \pm 2.1\%$ ,  $n = 11$ ;  $p = 0.66$  vs  $\Delta$ 2-135) equivalent to that observed with the  $\Delta$ 2-135 channel, was obtained when a cysteine substituted the endogenous glycine in position 546 of this linker (hERG  $\Delta$ 2-135/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  $\Delta$ 2-135/G546C construct. Very reduced  $E_{\text{FRET}}$  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  $\Delta$ 2-135 channels (Fig. 3), but also with the V3C and V8C mutated N1-135/YFP fragments, which were able to partially restore hERG  $\Delta$ 2-135 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.

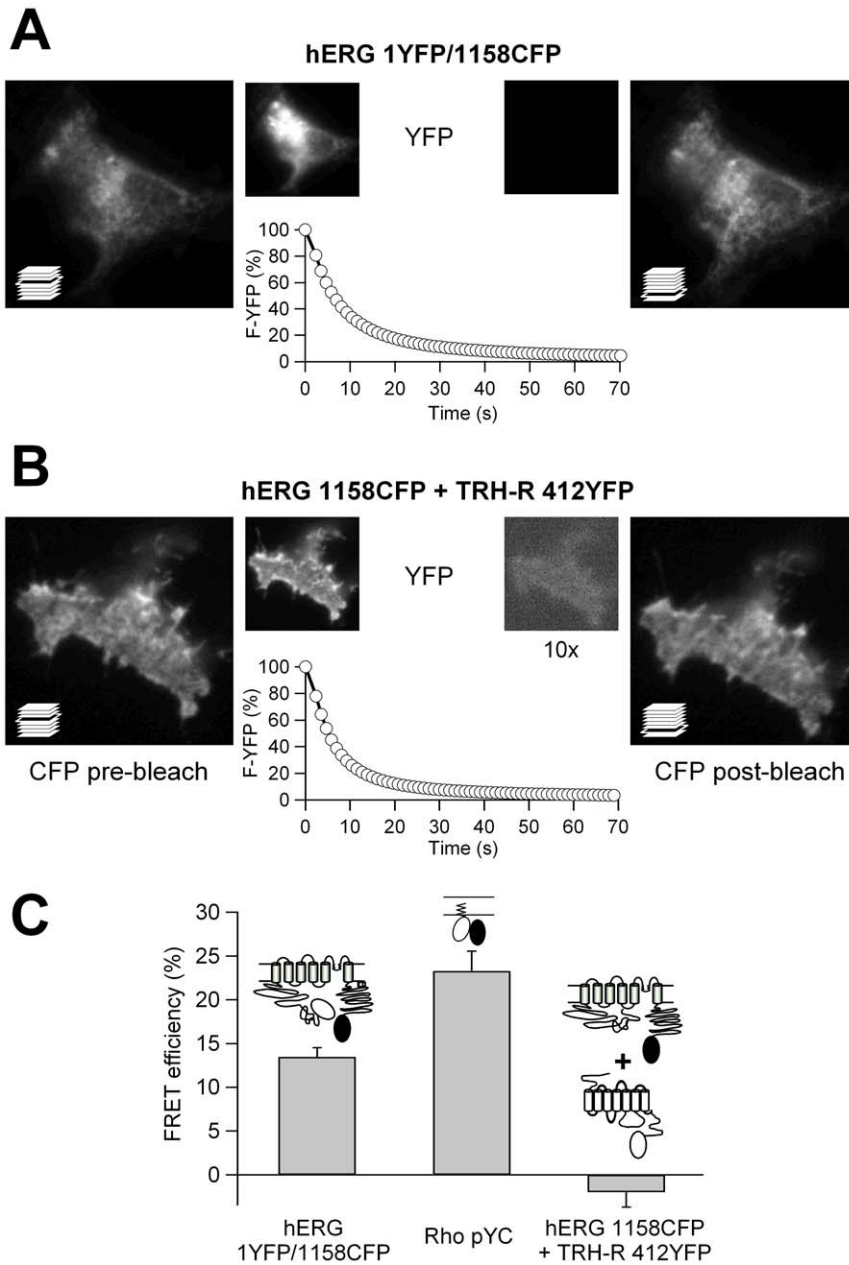
### Discussion

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  $\Delta$ 2-135 and the *eag* domain, which fully restores the slow channel deactivation.

Noticeably, the FRET was negligible between the N1-135/YFP fragment and the  $\Delta$ 2-135 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.

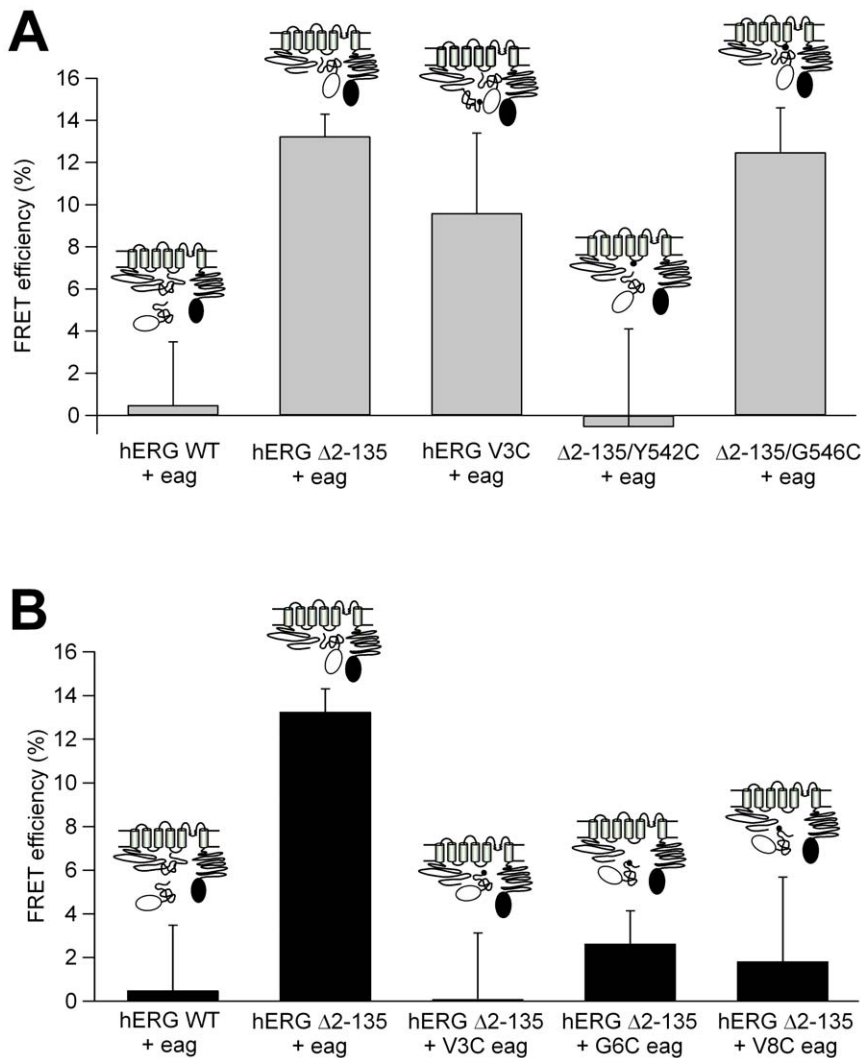
The fact that the *eag* domain-dependent recovery effect is impaired by point mutations both in the initial portions of the N1-135 *eag* domain and in the S4–S5 linker suggests that an interaction takes place between these regions in the full-length channels in order to regulate deactivation gating. 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  $E_{\text{FRET}}$  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  $\Delta G_0$ , 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  $E_{\text{FRET}}$  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  $E_{\text{FRET}}$  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  $E_{\text{FRET}}$  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 transmembrane 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  $\alpha$ -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  $\Delta 2-9$  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  $\Delta 2-135$  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 transmembrane 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  $\alpha$ -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 amphipathic  $\alpha$ -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  $\Delta 2-135$  deletion.**

## References

1. Sanguinetti MC, Jiang C, Curran ME, Keating MT (1995) A mechanistic link between an inherited and an acquired 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.

Pulse protocol and voltage-clamp recordings of a family of currents from h-ERG  $\Delta 2-135$  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  $h(V) = I_{max} / [1 + \exp((V - V_{0.5})/k)]$ , 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 PdIP. Performed the experiments: JF-T FB PdIP. Analyzed the data: JF-T FB PdIP. Contributed reagents/materials/analysis tools: JF-T FB AM LC PD PdIP. Wrote the paper: FB PdIP.

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) Acquired 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. *Toxicol* 49: 239–248.
13. Raschi E, Vasina V, E. Poluzzi E, De Ponti F (2008) The hERG K<sup>+</sup> channel: target and antitarget strategies in drug development. *Pharmacol Res* 57: 181–195.
14. Arcangeli A, Crociani O, Lastraioli E, Masi A, Pilozi 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, Baukowitz 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<sup>+</sup> 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<sub>Kr</sub> 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<sup>+</sup> channels. *Biophys J* 79: 749–758.
24. Vilorio 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<sup>+</sup> 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  $\alpha$ -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<sup>+</sup> 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, Rada 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, Machin 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<sub>3</sub> rat anterior pituitary cells. *Biochem J* 284: 891–899.
33. Barros F, Gómez-Varela D, Vilorio CG, Palomero T, Giráldez T, de la Peña P (1998) Modulation of human *erg* K<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sub>B</sub> receptors with Kir3 channels and regulators of G protein signalling (RGS4) proteins. *J Physiol* 580: 51–65.
37. Gómez-Varela D, Barros F, Vilorio 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<sup>+</sup> channels in GH<sub>3</sub> 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-a-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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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  $\beta$  subunit-T1 assembly of voltage-dependent K<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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.

# Cell type influences the molecular mechanisms involved in hormonal regulation of ERG K<sup>+</sup> 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<sup>2+</sup> levels has been shown to rely on G<sub>q/11</sub> and PLC activation, the molecular mechanisms involved in the regulation of ERG K<sup>+</sup> channels by TRH are still partially unknown. We have analysed the effects of βγ 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<sub>3</sub> cells β-ARK/CT, Gα<sub>i</sub>, and phosducin significantly reduced TRH inhibition of rERG currents, whereas in HEK-H36/T1 cells permanently expressing TRH-R and hERG, neither of the βγ scavengers affected the TRH-induced shift in V<sub>1/2</sub>. 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<sub>3</sub> cells. Indeed, wortmannin or long insulin pretreatment also blocked TRH regulation of ERG currents in HEK-H36/T1 but not in GH<sub>3</sub> 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<sup>2+</sup> and ERG responses in GH<sub>3</sub> 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<sub>3</sub> 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<sup>+</sup> 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 syncope 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  $\alpha$  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 phosphodiesterase 4 cDNA was cloned as a Hind III fragment in pcDNA3.1/Hygro (Invitrogen). The carboxy-terminal segment of the  $\beta$ -adrenergic receptor kinase ( $\beta$ -ARK/CT or  $\beta$ -ARK1 (438–689) carboxyl-terminal minigene [34]) cloned in 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- $\beta$ -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  $\mu$ g of plasmids containing the different constructs and 0.5  $\mu$ g of pEGFP-C1 coding for green fluorescent protein (EGFP) as a marker for transfection (ratio 10:1) were used. The mixture of 5.5  $\mu$ g 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 M $\Omega$  when filled with the pipette solution containing (in mM): 65 KCl, 30 K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 NaCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 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<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (see below) contained (in mM): 137 NaCl, 4 KCl, 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 glucose, and 10 HEPES (pH 7.4 with NaOH). Recordings of rERG currents in GH<sub>3</sub> cells were performed after changing the extracellular medium to high-K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>-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<sub>2</sub>, 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:

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

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<sub>3</sub> 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<sup>2+</sup> concentrations ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) were performed in cells plated on poly-L-lysine-coated coverslips as indicated above. Procedures for cell loading with the Ca<sup>2+</sup>-sensitive dye Fura-2 and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> recordings have been detailed elsewhere [40]. Ca<sup>2+</sup> 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<sub>3</sub> 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<sub>3</sub> 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'-CGCTAA-TACGACTCACTATAGGG) attached to their 5' end. Human Akt1 cDNA was amplified from positions 1335 to 2105 (forward: 5'-T7-CCACCATGAAGACCTTTTGC; reverse: 5'-T7-ACACCCGAGAACAACTGG) and rat Akt1 cDNA was amplified from positions 359 to 1427 (forward: 5'-T7-TGGCTGATGGACTCAAACGG; reverse: 5'-T7-TCCACA CACTCCATGCTGTC). 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<sup>®</sup> T7 High Yield Transcription Kit (Ambion), and the dsRNAs were purified and quantified. Finally, dsRNAs were treated with BLOCK-iT<sup>™</sup> Dicer Enzyme (Invitrogen), and siRNAs mixtures purified from uncut dsRNA fragments using BLOCK-iT<sup>™</sup> 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'-ACUUCUCCUCAAGAAUGATT), 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<sub>3</sub> cells were transfected with 0.5–1.0  $\mu$ g of the corresponding siRNAs mix or 100 pmol of the specific siRNA, plus 1  $\mu$ g of pEGFP-C1 plasmid, using 3  $\mu$ l of Lipofectamine 2000 in 300  $\mu$ l 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  $\mu$ g 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<sub>3</sub> cells was only measured in fluorescent cells (i.e. transfected with pEGFP-C1) after sorting them with a FAC-Star Plus Cell Sorter (Becton Dickinson), in order to better estimate the siRNAs effects. Cells were washed and



collected in PBS, resuspended in 100  $\mu$ l 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 $\times$ *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 $\pm$ 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 $\beta\gamma$ scavengers on TRH-induced modulation of ERG channels

Previous work from our laboratory indicated that introduction in GH<sub>3</sub> adenohypophysial cells of G $\alpha_t$ , able to act as a scavenger of  $\beta\gamma$  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  $\beta$ -adrenergic receptor kinase ( $\beta$ -ARK/CT), an agent able to effectively bind and sequester free  $\beta\gamma$  complexes when dissociated from G $\alpha$  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<sub>3</sub> 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<sub>3</sub> cells and quantification of its TRH-induced inhibition was performed in high-K<sup>+</sup> low-Ca<sup>2+</sup> 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<sup>2+</sup> currents and the subsequent activation of the Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> currents also present in these cells [3, 6, 8]. Furthermore, 5  $\mu$ M 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<sub>3</sub> cells transfected with or without  $\beta\gamma$  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 $\pm$ 3.5% (*n*=4) in control cells to 35.5 $\pm$ 7.2% (*n*=6) in the presence of  $\beta$ ARK/CT (*p*<0.005). As final confirmation that free  $\beta\gamma$  dimers are indeed necessary for the TRH effects in GH<sub>3</sub> cells, we also used phosducin, another agent known to bind free  $\beta\gamma$  dimers with high affinity, blocking their action [12]. In this case, the TRH-induced inhibition of the GH<sub>3</sub> rERG was reduced to 37.2 $\pm$ 3.6% (*n*=6, *p*<0.001) in GH<sub>3</sub> cells overexpressing phosducin (Fig. 1). Interestingly, the impairment of the TRH-induced inhibition of the currents caused by the  $\beta\gamma$  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

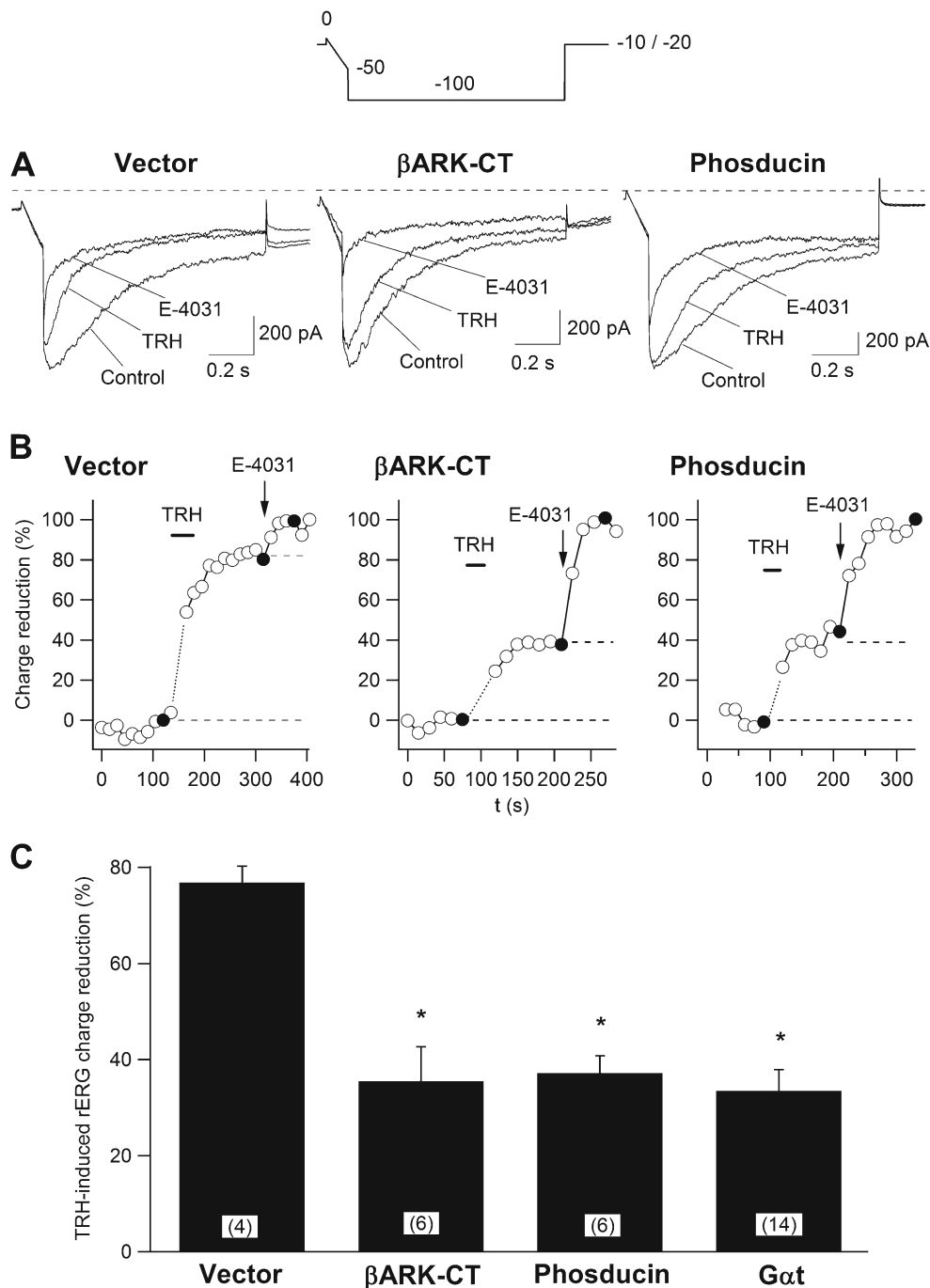


Fig. 1

**Fig. 1** G protein  $\beta\gamma$  dimer scavengers decrease TRH-induced inhibition of endogenous rERG currents in  $\text{GH}_3$  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  $\beta\gamma$  scavengers  $\beta$ -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  $1 \mu\text{M}$  TRH and  $5 \mu\text{M}$  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  $5 \mu\text{M}$  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  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^+$  channels due to massive liberation of  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{GH}_3$  cells transfected with  $\beta\gamma$  scavengers. Data corresponding to  $\beta$ -ARK/CT, phosducin, and  $\text{G}\alpha\text{t}$  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

$\pm 23$  ms deactivation time constant was reduced by TRH to  $123 \pm 10$  ms ( $n=4$ ;  $p < 0.01$ ), these values amounted  $234 \pm 16$  and  $156 \pm 15$  ms ( $n=6$ ;  $p < 0.01$ ) in cells transfected with  $\beta$ ARK/CT. Furthermore, in cells expressing phosducin, the deactivation time constants corresponded to  $292 \pm 37$  and  $164 \pm 30$  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  $\beta$ -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  $\beta\gamma$  dimer scavengers (Suppl. Fig. 1). Thus, the addition of 1  $\mu$ M 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  $124 \pm 2$  nM up to  $253 \pm 44$  nM ( $n=13$ ). These values amounted to  $120 \pm 20$  and  $221 \pm 20$  nM, respectively, in the  $\beta$ -ARK/CT-transfected cells ( $n=13$ ). Finally, the basal  $115 \pm 1$  nM  $[Ca^{2+}]_i$  was raised to an initial peak of  $257 \pm 20$  nM ( $n=18$ ) after adding TRH to the GH<sub>3</sub> 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<sub>3</sub> 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<sub>3</sub> 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  $\beta\gamma$  scavenger) induced a rightward shift of the hERG I/V curve that amounted to  $21.3 \pm 1.1$  mV ( $n=8$ ). This shift remained the same in the  $\beta$ -ARK/CT-transfected cells ( $21.8 \pm 2.0$  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  $\beta\gamma$  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  $138 \pm 11$  and  $973 \pm 114$  ms ( $n=7$ ) in the  $\beta$ -ARK/CT-transfected cells before TRH addition. These values were reduced by the hormone to  $94 \pm 11$  and  $627 \pm 65$  ms ( $p < 0.05$ ), respectively. This behaviour paralleled that observed in control cells without  $\beta$ -ARK/CT, showing fast and slow deactivation time constants of  $136 \pm 13$  and  $775 \pm 46$  ms ( $n=5$ ), that were reduced by TRH to  $85 \pm 6$  and  $460 \pm 30$  ms ( $p < 0.01$ ).

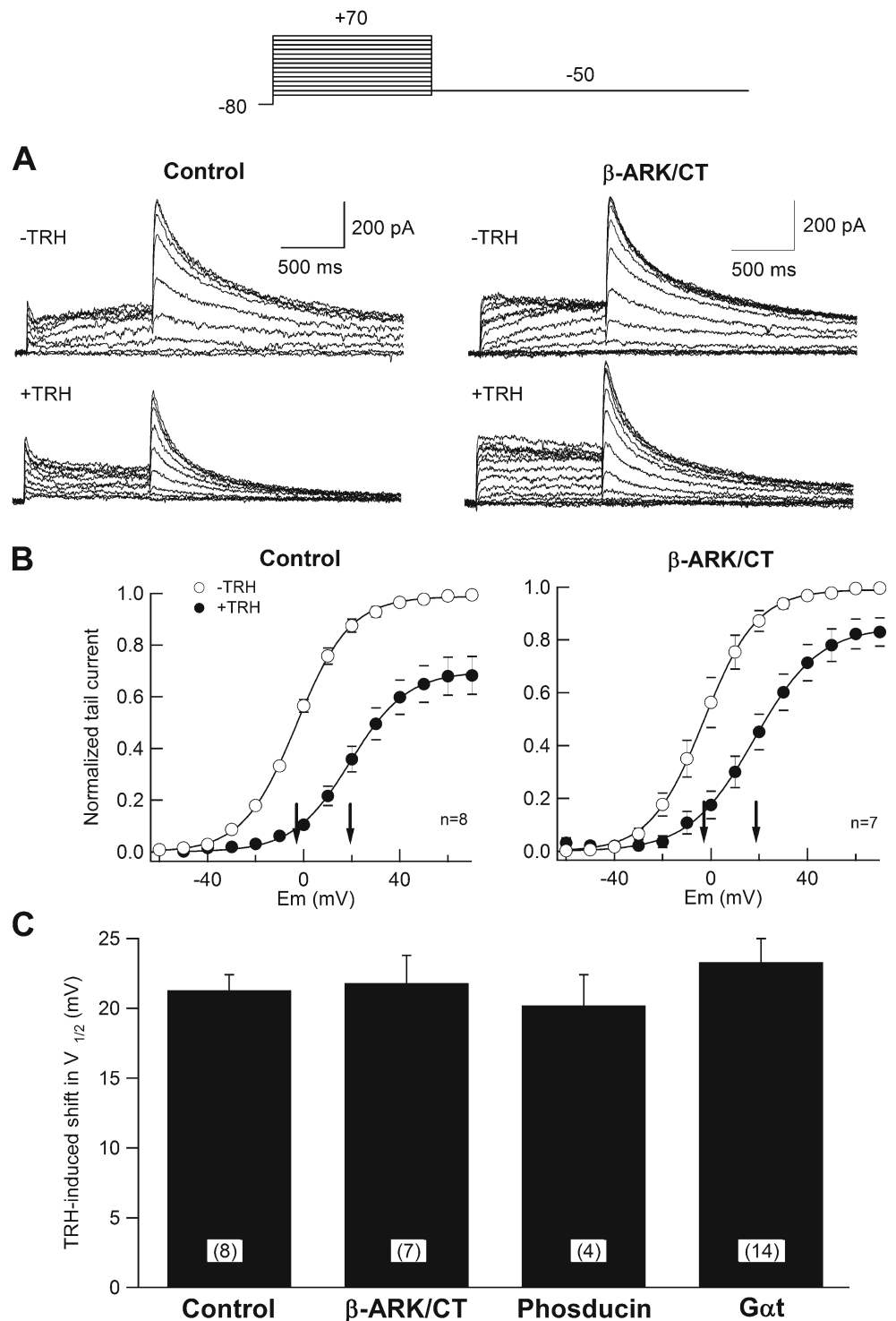
It seems unlikely that failure to modify these TRH-induced effects was due to lack of efficient expression of  $\beta$ -ARK/CT in these cells, since they showed much higher transfection efficiencies than those exhibited in the pituitary cells, in which the scavenger clearly reduced the hormone effects (see above). This interpretation is further supported by the data obtained with phosducin. In this case the activation voltage dependence shift amounted to  $20.2 \pm 2.2$  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  $\beta$ -ARK/CT, these data indicate that free  $\beta\gamma$  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<sub>3</sub> 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  $\alpha$  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<sub>3</sub> cells

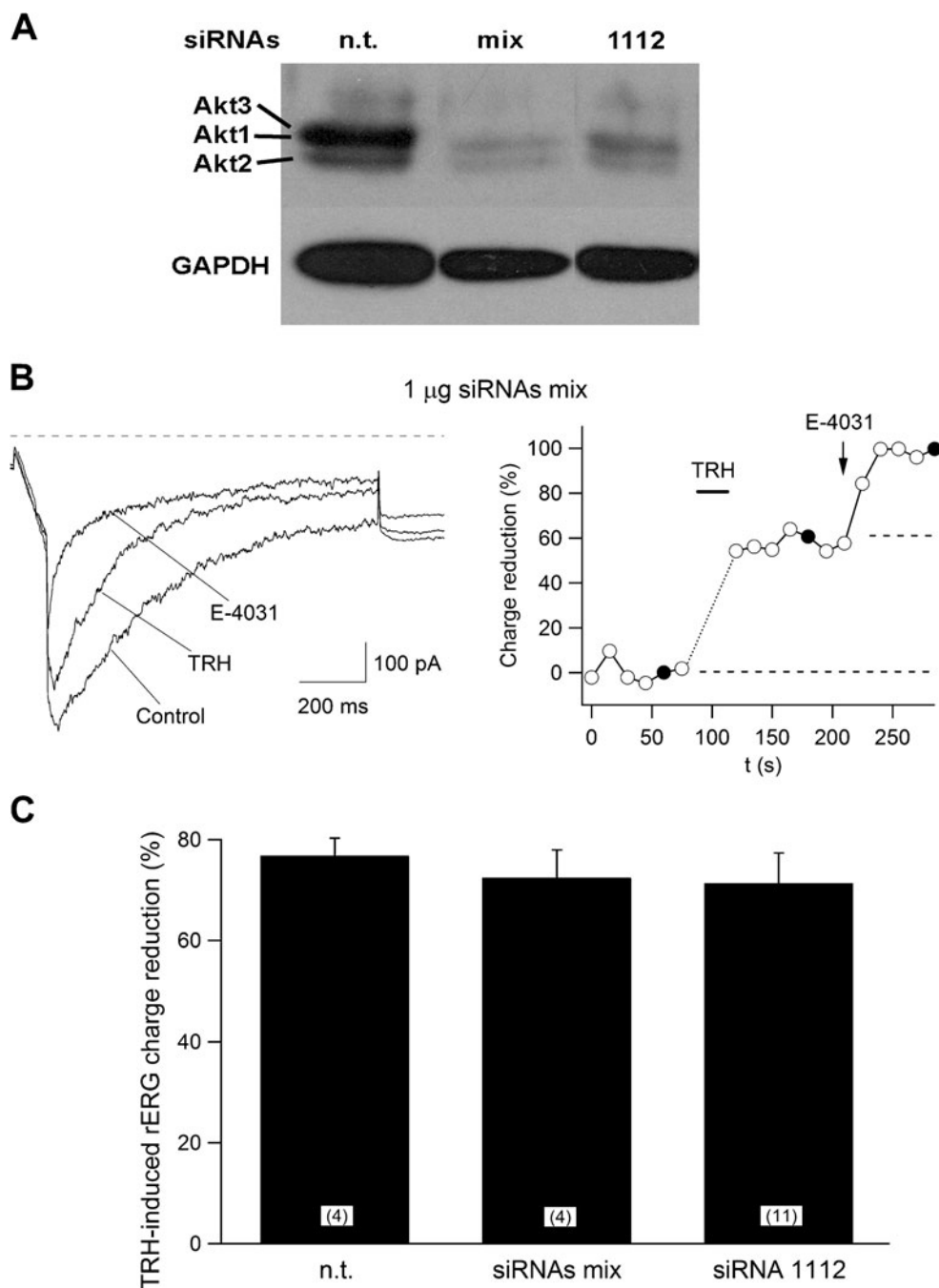
**Fig. 2** TRH-induced hERG modulation is not altered by  $\beta\gamma$  scavengers in HEK-H36/T1 cells. **a** Representative current traces in response to the voltage protocol depicted at the top are shown for two cells transfected with pcDNA.3 vector alone (*Control*) or with  $\beta$ -ARK/CT. Currents correspond to those recorded before ( $-$ TRH) and 2 min after adding 1  $\mu$ M 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  $\beta$ -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  $12.1 \pm 1.1$  and  $11.3 \pm 0.9$  ( $n=8$ ) with and without TRH in the control cells, and  $12.1 \pm 0.6$  and  $10.4 \pm 0.6$  ( $n=7$ ) in the cells transfected with  $\beta$ -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  $\beta\gamma$  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  $\mu$ g 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  $\mu$ g of the siRNAs mixture (Fig. 3a). As confirmation that Akt/PKB expression is not involved in the hormonal inhibition of rERG in the GH<sub>3</sub> cells, we also used a specific

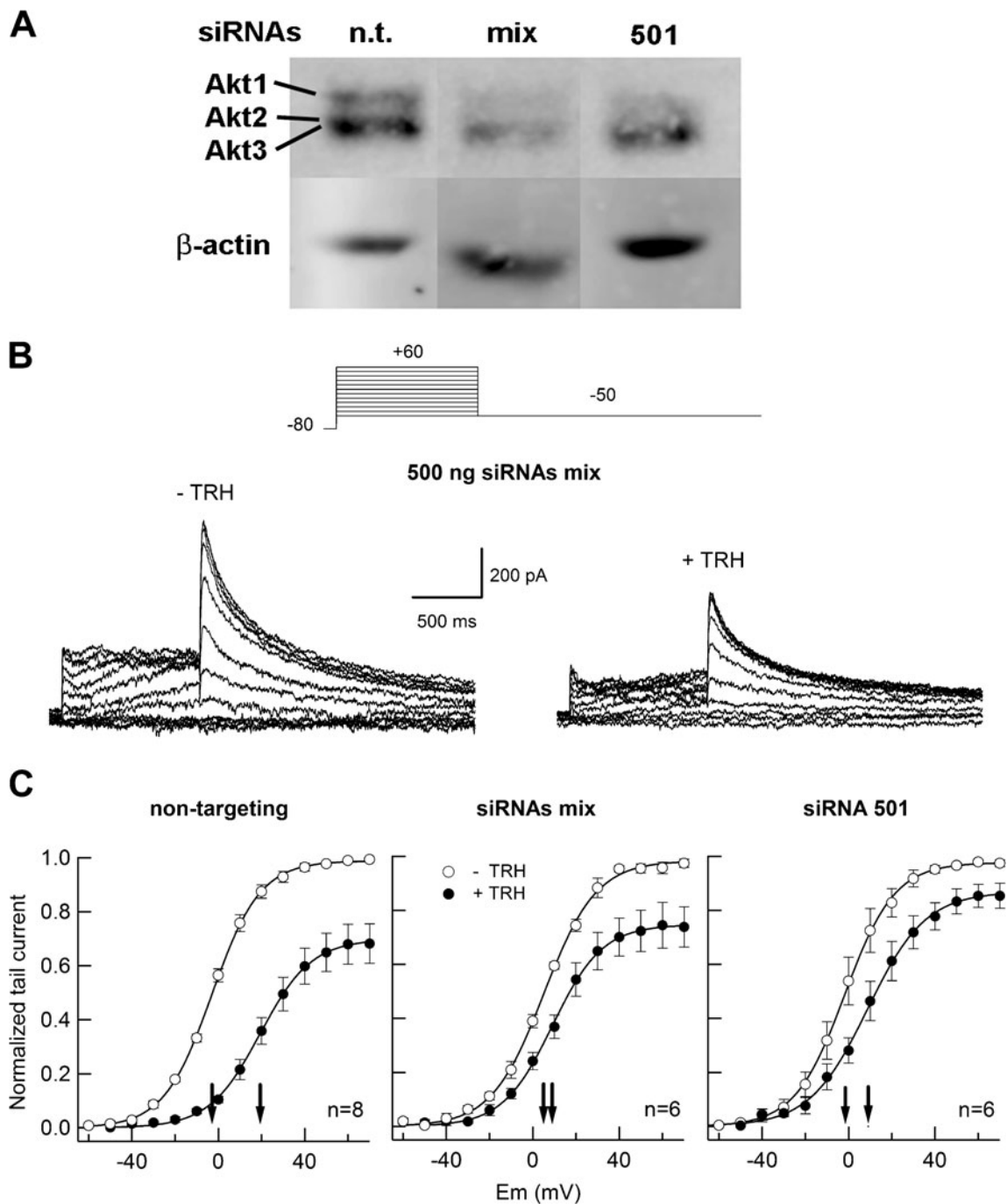
**Fig. 3** Knockdown of Akt/PKB does not interfere with rERG regulation by TRH in GH<sub>3</sub> cells. **a** Blockade of Akt/PKB expression by siRNAs in EGFP positive GH<sub>3</sub> cells. Cells were transfected with 1  $\mu$ g of non-targeting (*n.t.*) siRNAs, 1  $\mu$ g of anti-rat Akt1 siRNAs mix, or 1  $\mu$ g of anti-rat Akt1 siRNA 112, plus 1  $\mu$ g of pEGFP-C1 in each case, and after 48 h selected with a FAC-Star 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<sub>3</sub> cell rERG currents in the presence of anti-Akt siRNAs. Representative current traces from one cell transfected with 1  $\mu$ g of anti-Akt siRNA mix are shown on the *left*. Currents were recorded as indicated in Fig. 1 before and after addition of 1  $\mu$ M TRH and 5  $\mu$ M 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<sub>3</sub> cells transfected with 1  $\mu$ g of non-targeting siRNAs, anti-rat Akt siRNA mix, or anti-rat Akt1 specific 112 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  $\mu$ g of 1112 siRNA, an averaged rERG current inhibition of  $71.36 \pm 6\%$  ( $n=11$ ) 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  $\mu\text{g}$  of non-targeting (*n.t.*) siRNAs, 0.5  $\mu\text{g}$  of anti-human Akt siRNA mix or 1  $\mu\text{g}$  of anti-human Akt1 siRNA 501. Cell extracts were separated by 8% SDS-PAGE and subjected to immunodetection with anti-Akt and anti- $\beta$ -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  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{g}$ ), anti-Akt mix (0.5  $\mu\text{g}$ ), or 501 (1  $\mu\text{g}$ ). The slope factors of the curves in the cells transfected with the siRNAs mix amounted  $12.0 \pm 0.9$  and  $11.5 \pm 0.9$  ( $n=6$ ) without and with TRH, respectively. These values corresponded to  $11.2 \pm 0.3$  and  $12.4 \pm 0.5$  ( $n=6$ ) 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  $3.5 \pm 1.9$  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  $136 \pm 13$  and  $775 \pm 46$  ms ( $n=5$ ) before and  $85 \pm 6$  and  $460 \pm 30$  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  $152 \pm 28$  and  $824 \pm 43$  ms ( $n=3$ ) without TRH treatment, no significant alterations of these values were observed upon hormone addition to the cells, that showed values of  $132 \pm 13$  and  $727 \pm 73$  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  $36.2 \pm 4.4\%$  ( $n=8$ ) in non-transfected cells, whereas TRH addition produced  $24.6 \pm 4.0\%$  ( $n=6$ ,  $p=0.08$ ) 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  $\mu$ g 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  $10.4 \pm 1.9$  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  $39 \pm 1$  to  $198 \pm 3$  nM ( $n=35$ ,  $N=2$ ). Almost identical results were obtained in the siRNA-transfected cells: the  $[Ca^{2+}]_i$  increased from  $39 \pm 2$  to  $183 \pm 6$  nM ( $n=39$ ,  $N=3$ ) in cells in which fluorescence of the transfection marker EGFP was detected, and from  $35 \pm 2$  to  $173 \pm 11$  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<sub>3</sub> cells emphasizes again the influence of the cell type on the molecular mechanisms used by the hormone to modulate ERG channel functionality.

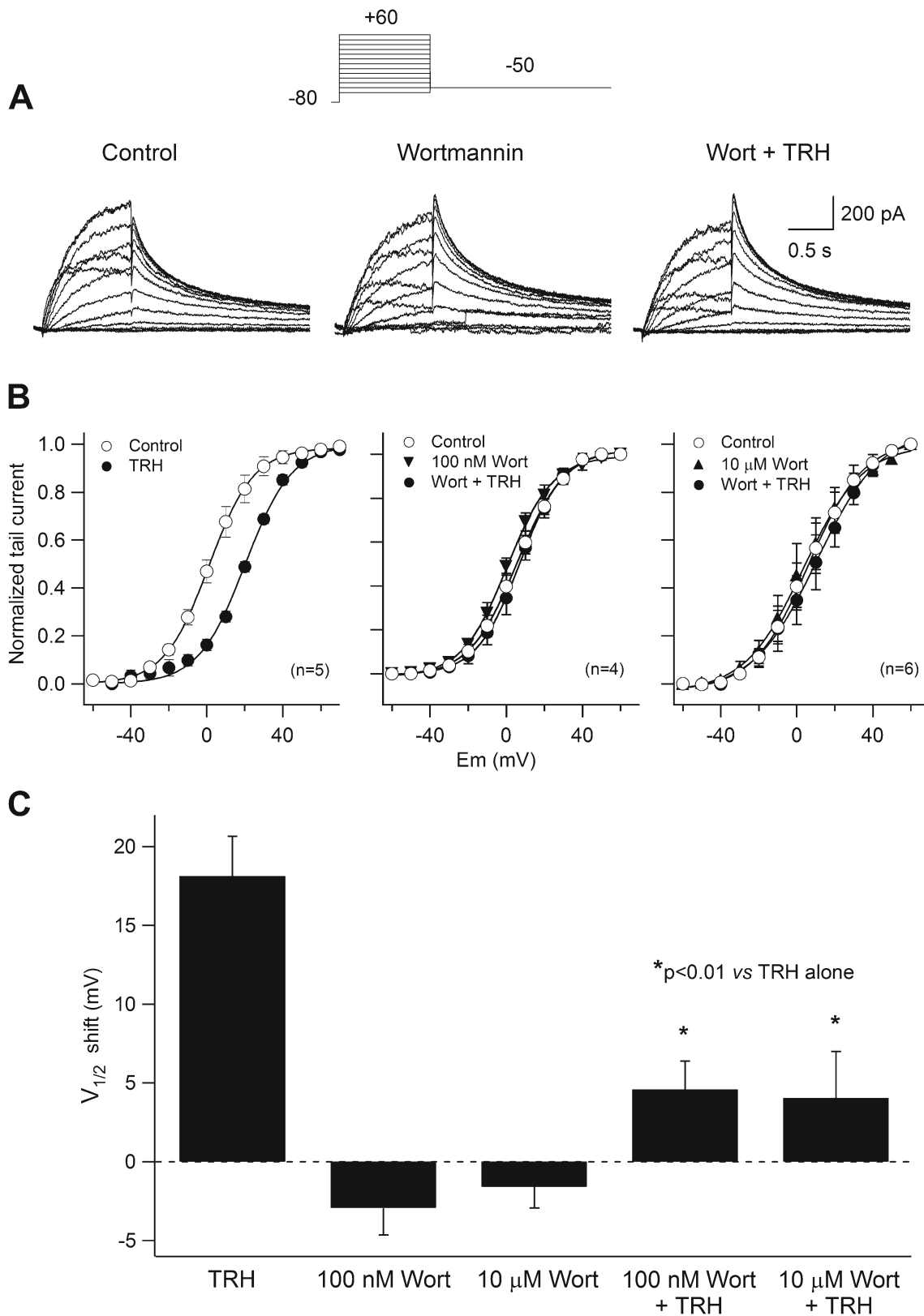
### Cell-dependent effect of pharmacological blockade of Akt/PKB activation on TRH-induced ERG modulation

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  $4.6 \pm 1.8$  mV ( $n=4$ ) with wortmannin;  $p<0.01$ ]. Almost identical results were obtained increasing the wortmannin level to 10  $\mu$ M, a concentration at which not only PI3K, but also PIP<sub>2</sub> resynthesis by phosphatidylinositol 4-kinase is impaired [42]. These results contrast with our previous data demonstrating that treatment of GH<sub>3</sub> cells with up to 10  $\mu$ M 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<sub>3</sub> 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<sub>3</sub> 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  $\mu$ M 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  $\mu$ M) 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

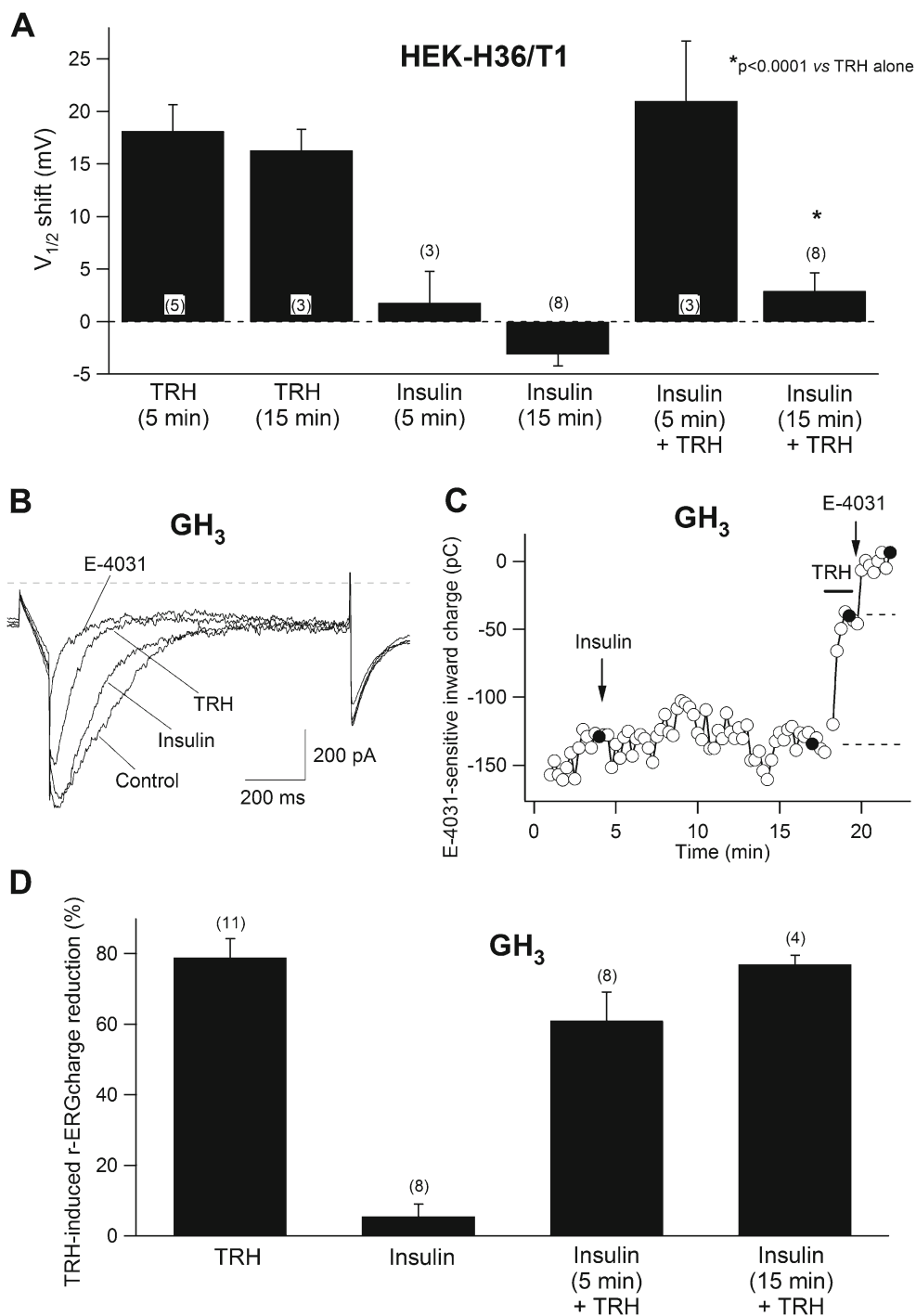


activator of the PI3K-Akt signalling cascade in a variety of cells [13, 21, 29]. In these experiments, 1 μM insulin was used to ensure proper and complete activation of Akt/PKB

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



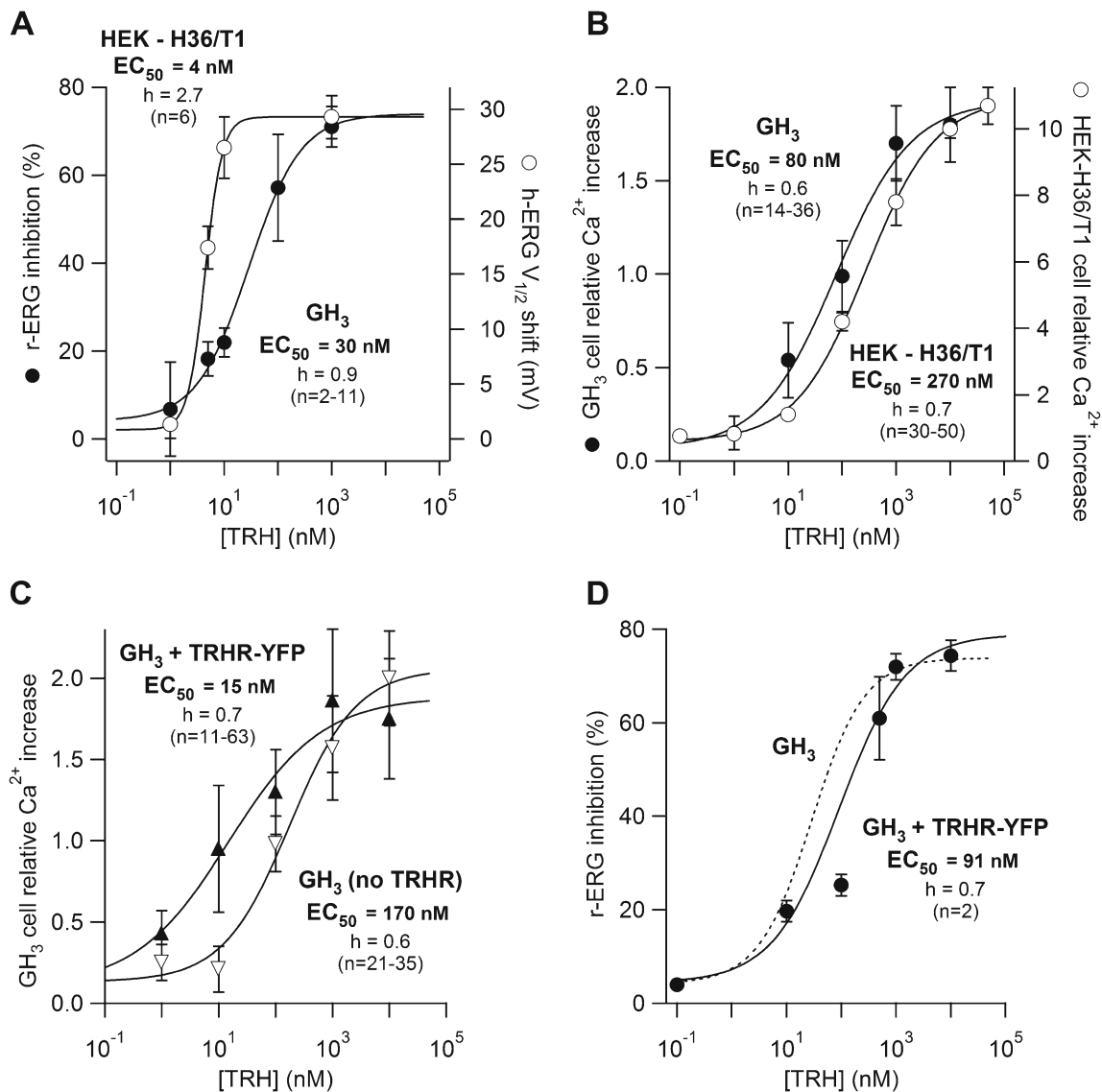
**Fig. 6** Cell-selective blockade of TRH-induced regulation of ERG currents by long-term treatment with insulin. **a** Quantification of insulin and TRH effects on activation voltage dependence shifts of HEK-H36/T1 cell hERG currents. Note that the shift values in the presence of TRH plus insulin refer 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<sub>3</sub> cell rERG currents. **c** Time course of insulin and TRH effects on GH<sub>3</sub> 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<sub>3</sub> 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  $21.0 \pm 5.7$  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 ( $2.9 \pm 1.7$  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<sub>3</sub> cells ( $78.9 \pm$

$5.4\%$ ,  $n=11$ ) was not significantly altered when they were previously incubated with  $1 \mu\text{M}$  insulin for 5 min ( $61.0 \pm 8.1\%$ ,  $n=8$ ;  $p=0.07$ ), 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 ( $77.0 \pm 2.6\%$  inhibition,  $n=4$ ;  $p=0.84$ ). Almost identical results pertaining to insulin effects and TRH treatments were obtained using GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub> cells (data not shown), a cloned variant of the GH<sub>3</sub> cells in which activation of the



**Fig. 7** Concentration dependence of TRH effects in HEK-H36/T1 cells and in GH<sub>3</sub> 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<sub>3</sub> (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<sub>3</sub> cells are depicted as in panel A. **c** Effect of TRH-R overexpression on TRH-induced  $[Ca^{2+}]_i$  increases in GH<sub>3</sub> 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<sub>3</sub> 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<sub>3</sub> pituitary cells that selectively express the TRH-R1 receptor [51]. Even though two alternatively spliced isoforms of TRH-R1 have been recognized in GH<sub>3</sub> 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<sub>3</sub> cells. When the dose dependence of the rERG inhibition and the  $[Ca^{2+}]_i$  responses to TRH were examined in GH<sub>3</sub> 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  $K_d$  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<sub>3</sub> 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<sub>3</sub> 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<sub>3</sub> 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<sub>3</sub> 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<sub>3</sub> 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<sub>3</sub> 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  $\beta$ -ARK/CT [34] and phosducin [12], as well as the previously employed  $G\alpha_i$  [40]. All three scavengers were able to significantly reduce the TRH-evoked rERG current inhibition in GH<sub>3</sub> 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<sub>3</sub> cell rERG currents, since the

presence of the scavengers did not modify the  $G_{q11}$ - and PLC-dependent intracellular  $Ca^{2+}$  rise also caused by TRH in these cells. In contrast to the behaviour observed in GH<sub>3</sub> 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<sub>3</sub> 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<sub>3</sub> 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<sub>3</sub> 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<sub>3</sub> 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<sub>3</sub> cells [33, 48]. Also, the existence of a different set of auxiliary  $\beta$  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  $\alpha$ -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<sub>3</sub> 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  $\alpha$ -G<sub>o</sub> is much greater in SH-SY5Y compared to HEK293 cells, despite a similar abundance of  $\alpha$ -G<sub>o</sub> 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  $\beta\gamma$  dimers but not Akt/PKB in GH<sub>3</sub> cells, whereas in HEK-H36/T1 cells it implicates Akt/PKB but not  $\beta\gamma$  dimers. Noticeably,  $\beta\gamma$  dimers liberated by GPCRs from G<sub>i</sub> proteins reportedly bind to and activate PI3K $\gamma$  [26, 29]. However, TRH-R coupling to G<sub>i</sub> is not apparently involved in the modulation of rERG channels of the GH<sub>3</sub> 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<sup>+</sup> channels via G<sub>i</sub> (Barros F. and Miranda P., unpublished results). This could explain the inability of the hormone to modulate the GH<sub>3</sub> rERG current via Akt/PKB. It would also be consistent with our proposal that a specific set of  $\beta\gamma$  subunits released from a G<sub>s</sub> or G<sub>13</sub> transducer is responsible for the TRH-induced ERG regulation in the GH<sub>3</sub>, 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

- 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
- 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<sub>3</sub> anterior pituitary cells. *FEBS Lett* 279:33–37
- Barros F, Delgado LM, del Camino D, de la Peña P (1992) Characteristics and modulation by thyrotropin-releasing hormone of an inwardly rectifying K<sup>+</sup> current in patch-perforated GH<sub>3</sub> anterior pituitary cells. *Pflügers Arch* 422:31–39
- Barros F, Mieskes G, del Camino D, de la Peña P (1993) Protein phosphatase 2A reverses inhibition of inward rectifying K<sup>+</sup> currents by thyrotropin-releasing hormone in GH<sub>3</sub> pituitary cells. *FEBS Lett* 336:433–439
- Barros F, Villalobos C, García-Sancho J, del Camino D, de la Peña P (1994) The role of the inwardly rectifying K<sup>+</sup> current in resting potential and thyrotropin-releasing hormone-induced changes in cell excitability of GH<sub>3</sub> rat anterior pituitary cells. *Pflügers Arch* 426:221–230
- Barros F, del Camino D, Pardo LA, Palomero T, Giráldez T, de la Peña P (1997) Demonstration of an inwardly rectifying K<sup>+</sup> current component modulated by thyrotropin-releasing hormone and caffeine in GH<sub>3</sub> rat anterior pituitary cells. *Pflügers Arch* 435:119–129
- Barros F, Gomez-Varela D, Vilorio CG, Palomero T, Giráldez T, de la Peña P (1998) Modulation of human erg K<sup>+</sup> channel gating by activation of a G protein-coupled receptor and protein kinase C. *J Physiol* 511:333–346
- Bauer CK, Meyerhof W, Schwarz JR (1990) An inward-rectifying K<sup>+</sup> current in clonal rat pituitary cells and its modulation by thyrotropin-releasing hormone. *J Physiol* 429:169–189
- 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
- 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
- Beitner-Johnson D, LeRoith D (1995) Insulin-like growth factor-I stimulates tyrosine phosphorylation of endogenous c-Crk. *J Biol Chem* 270:5187–5190
- Blüml K, Schnepf W, Schröder S, Beyermann M, Macias M, Oschkinat H, Lohse MJ (1997) A small region in phosphoinositide 3-kinase G-protein betagamma-subunit function. *EMBO J* 16:4908–4915
- Brazil DP, Hemmings BA (2001) Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem Sci* 26:657–664
- 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
- Chabre O, Conklin BR, Brandon S, Bourne HR, Limbird LE (1994) Coupling of the  $\alpha_{2A}$ -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
- Chiang C-E, Roden DM (2000) The long QT syndromes: genetic basis and clinical implications. *J Am Coll Cardiol* 36:1–12
- Cleland TA, Linster C (1999) Concentration tuning mediated by spare receptor capacity in olfactory sensory neurons: a theoretical study. *Neural Comput* 11:1673–1690
- 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
- de la Peña P, Delgado LM, del Camino D, Barros F (1992) Cloning and expression of the thyrotropin-releasing hormone receptor from GH<sub>3</sub> rat anterior pituitary cells. *Biochem J* 284:891–899
- 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
- Franke TF (2008) PI3K/Akt: getting it right matters. *Oncogene* 27:6473–6488
- 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<sub>3</sub> 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 pharmacological 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<sup>+</sup> channels are dominated by the *erg1b* 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)  $\alpha_2$ -C10 adrenergic receptors expressed in Rat 1 fibroblasts car regulate both adenylyl cyclase 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<sup>+</sup> channels in GH<sub>3</sub> 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<sup>+</sup> 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, Vilorio 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. Pflieger 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 triphosphate 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<sup>+</sup> 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. *Toxicol* 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<sub>3</sub>/B6 cells). *Pflugers 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<sup>+</sup> 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