

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE ANATOMIA, HISTOLOGIA Y NEUROCIENCIA

Mecanismos moleculares implicados en la
potenciación de canales de potasio KCNQ2/3

INSTITUTO CAJAL

CSIC

Memoria presentada por Ainhoa
Etxeberria Larraza para optar al grado de
Doctor por la Universidad Autónoma de
Madrid y dirigida por el Dr. Alvaro
Villarroel Muñoz.

Este trabajo doctoral ha sido realizado en el **Instituto Cajal** (CSIC) con el apoyo de de una beca de Formación de Investigadores del Gobierno Vasco - Eusko Jaurlaritza.

1. INTRODUCCIÓN 1

- La función principal de los canales iónicos es permitir el paso de los iones a través de la membrana 1
- La señalización se basa en cambios en el potencial de reposo mediados por canales iónicos 2
- La transmisión de información se codifica en forma de potenciales de acción 3
- El potencial de acción es producido por canales de sodio y potasio activados por voltaje 4
- La hiperexcitabilidad eléctrica puede deberse a mutaciones que reducen la función de los canales de K^+ 5
- El canal de potasio está compuesto por el ensamblaje de cuatro subunidades colocadas simétricamente alrededor del poro 6
- La selectividad a K^+ se consigue imitando la hidratación de los iones en solución acuosa 9
- El poro del canal de potasio KcsA en estado cerrado muestra una estructura en forma de embudo 11
- El sensor de voltaje detecta la diferencia de potencial entre el interior y el exterior de la célula 13
- De los nueve genes de canales de potasio mutados en enfermedades humanas cuatro codifican canales de potasio de la familia KCNQ 14
- La subunidad KCNQ1 repolariza el potencial de acción cardíaco 15
- Mutaciones en KCNQ4 producen la acumulación de K^+ en el oído produciendo sordera 15
- El papel fisiológico de KCNQ5 sigue siendo enigmático 16
- Mutaciones en las subunidades KCNQ2 y KCNQ3 producen una forma rara de epilepsia 17
- Reducciones modestas en la corriente Q2/Q3 son suficientes para alcanzar niveles epileptogénicos 18
- La asociación de las subunidades Q2 y Q3 produce una potenciación dramática en la corriente 19
- La corriente M actúa como freno del disparo del potencial de acción 20

Una intrincada red molecular controla la inhibición de la corriente KCNQ/M	22
La región C-terminal del canal es crucial para la interacción con otras proteínas	24
Dime que canales tienes y te diré quien eres	26
Las subunidades KCNQ no se ensamblan indiscrimina	26
La célula selecciona y localiza en la membrana los canales precisos mediante señales de transporte	27
Drogas moduladoras de canales KCNQ/M han sido propuestas para el tratamiento de la epilepsia, y otras enfermedades neurológicas	28

2. MÉTODOS 30

2.1. BIOLOGÍA MOLECULAR	30
Construcción de quimeras y mutantes	30
Secuenciación	33
2.2 EXPRESIÓN EN OVOCITOS DE <i>XENOPUS LAEVIS</i>	34
Síntesis de ARN mensajero	34
Preparación de ovocitos	35
Microinyección de ARNm	35
2.3. REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS	35
Registros de doble electrodo	35
Patch-clamp	37
Análisis de datos	38
2.4. EXPRESIÓN EN SUPERFICIE	39
2.5. EXPRESIÓN EN CÉLULAS DE MAMÍFERO	40
Inmunoprecipitación	41
Western blot	43
Anticuerpos	44

3. RESULTADOS 45

3.1. MECANISMOS MOLECULARES DE LA POTENCIACIÓN DE CANALES

Q2/Q3 45

La región transmembranal de Q2 es necesaria para aumentar la corriente de Q3 45

Un residuo localizado en el poro es crítico para la potenciación de la corriente 49

El residuo del poro A/T controla la inactivación de la corriente 52

¿De que factores depende la corriente macroscópica? 53

La expresión en superficie se monitorizó etiquetando la subunidad Q3 54

La región C-terminal controla el número de canales en membrana 55

La expresión en superficie de la subunidad Q3 es controlada por el residuo A315 localizado en el poro 58

El lazo extracelular 5 de Q3 podría contener una señal de exportación y/o reciclaje 60

El residuo Q3_{A315} podría formar parte del sitio de unión de un bloqueante interno 61

La región N-terminal controla la amplitud de la corriente 63

La región C-terminal cambia la sensibilidad a voltaje y los niveles de corriente 67

3.2. FISIOPATOLOGÍA DE LA EPILEPSIA EN HUMANOS CAUDASA POR

MUTACIONES EN KCNQ2 70

Mutaciones que producen BFNC reducen la corriente 70

Mutaciones asociadas a BFNC reducen la corriente porque su expresión en membrana está alterada 72

Las mutaciones en Q2 no afectan al ensamblaje con Q3 73

La reducción en expresión en superficie se asocia con alteraciones en la interacción del canal con CaM 74

La mutación Q2_{K526N} altera la regulación de la corriente ejercida por CaM 78

4. DISCUSIÓN 82

- Un residuo del poro convierte a Q3 en una subunidad silenciosa 82
- El poro de la subunidad Q3 podría formar el sitio de unión de un bloqueante interno 87
- La heteromerización del C-terminal permite el transporte a la membrana de canales Q2/Q3 88
- La alteración de la unión del canal con CaM se asocia con defectos en el tráfico de los canales 90
- Varios mecanismos convergen para facilitar el tráfico de los canales “elegidos” 94
- Las regiones intracelulares N y C-terminales podrían controlar la amplitud de la corriente mediante la interacción con PIP₂ 95
- La mutación Q2_{K526N} que se asocia con epilepsia y retraso mental afecta a la interacción del canal con calmodulina 99

5. CONCLUSIONES 103

6. BIBLIOGRAFÍA 104

Anexo 1. Mutaciones asociadas a BFNC en Q2 y Q3 121

Anexo 2. Vectores 123

Anexo 3. Registros de doble electrodo 124

Electrodos 125

Errores 125

Filtro 226

Anexo 4. Three Mechanisms Underlie KCNQ2/3 · Heteromeric Potassium M-Channel Potentiation. Ainhoa Etxeberria, Irene Santana-Castro, M.Paz Regalado, Paloma Aivar, and Alvaro Villarroel. J.Neurosci, October 13, 24(41):9146-9152, 2004.

1 Introducción

¿Qué tienen en común síndromes como la epilepsia, la diabetes, la sordera y la hipertensión? Estas enfermedades humanas pueden ser causadas por el funcionamiento anómalo de canales iónicos y cuando esta es la causa se conocen en su conjunto como **canalopatías**. La primera mutación en un canal iónico causante de una enfermedad, la parálisis periódica hipercalémica, fue identificada en 1991 (Ptacek et al., 1991). Ahora la lista incluye cientos de genes implicados en más de 20 enfermedades neuronales, musculares, cardíacas y endocrinas (ver Tabla 2). La asociación de tan diversas enfermedades con la disfunción de canales iónicos ha sido posible combinando estudios electrofisiológicos, moleculares y genéticos. Además, estos estudios han ayudado a entender como funcionan los canales iónicos en circunstancias normales.

La función principal de los canales iónicos es permitir el paso de los iones a través de la membrana.

El poro del canal constituye la abertura por donde los iones atraviesan la membrana y sus propiedades proporcionan selectividad a ciertas especies iónicas. De esta manera, los clasificamos en canales de sodio (Na^+), de potasio (K^+), de calcio (Ca^{2+}), de cloro (Cl^-), o pueden ser de cationes o aniones en general. Los canales iónicos sufren cambios conformacionales que provocan la apertura y el cierre del poro del canal en cuestión de milisegundos (estos cambios conformacionales se llaman colectivamente “*gating*”). La apertura de los canales está acoplada a mecanismos que detectan señales celulares como cambios en el voltaje, señales químicas (un neurotransmisor, niveles de calcio o ATP) o señales mecánicas. Cuando los canales se abren, el movimiento de iones por su través genera las señales eléctricas de las neuronas y otras células excitables, como las células musculares. Estas señales y el consiguiente aumento transitorio de calcio intracelular controlan la contracción muscular, el latido del corazón, la secreción de hormonas, las sensaciones y el procesamiento de información en el cerebro.

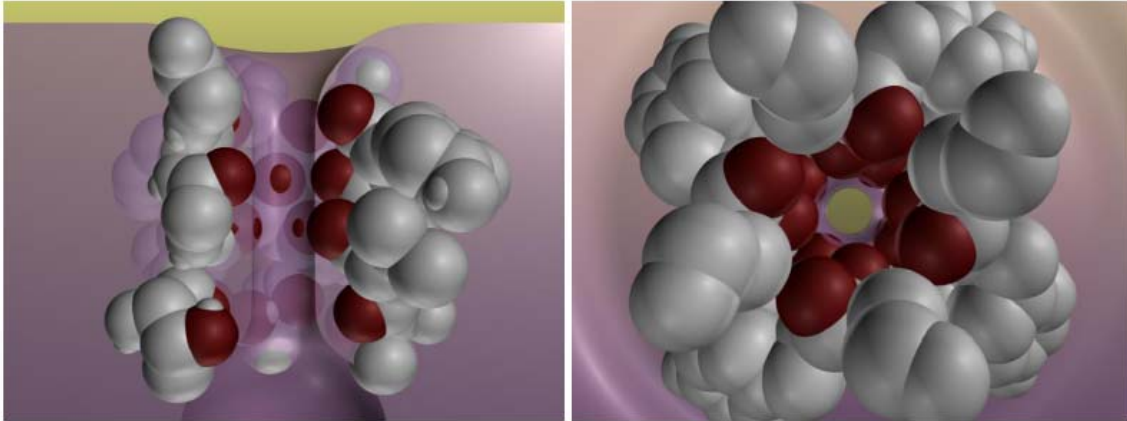
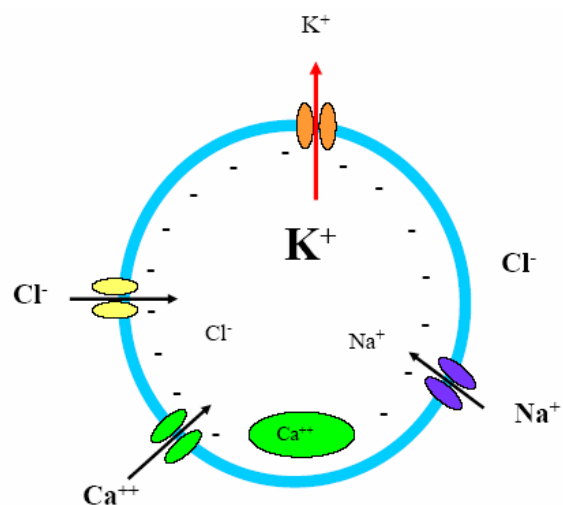


Figura 1. Vista tridimensional lateral y superior de un canal iónico. Los canales permiten a los iones entrar y salir de la célula atravesando la membrana plasmática. <http://langevin.anu.edu.au/>

La señalización se basa en cambios en el potencial de membrana mediados por canales iónicos.

Las neuronas (al igual que el resto de las células) mantienen una diferencia de potencial transmembrana más o menos constante llamada **potencial de reposo** (~ -70 mV), siendo el interior de la célula negativo con respecto al exterior. El potencial de reposo se debe a las proteínas cargadas negativamente que no pueden atravesar la membrana y la distribución asimétrica de iones Na^+ , K^+ y Cl^- que se mantiene por bombas iónicas, transportadores e intercambiadores. Las diferencias de concentración transmembrana de K^+ y Na^+ se establecen por un proceso metabólico de transporte o bomba Na^+/K^+ , que traslada Na^+ al exterior celular y K^+ al interior celular, manteniendo alta la concentración de potasio ($[\text{K}^+]_i$). Gracias a este gradiente de concentración, cuando los canales iónicos se abren dejan pasar de forma pasiva miles de iones por su través (10^6 - 10^8 por s) y las corrientes iónicas resultantes median las modificaciones del potencial de membrana. Por tanto, los iones fluyen a través de los canales, como una pelota colina abajo, a favor de su **gradiente electroquímico**. Este gradiente consta de dos factores: el gradiente de voltaje y el gradiente de concentración para ese ión a través de la membrana. Cuando un canal de potasio se abre, el potencial de membrana se aproxima al potencial de equilibrio del K^+



que para una célula típica es -88 mV. Es decir, el K^+ hiperpolariza la célula, la hace más negativa. De la misma forma el aumento de la conductancia de Na^+ despolariza la membrana llevando el potencial a $+69$ mV (Tabla 1). El potencial de equilibrio (potencial de Nerst, E_N) para cada ión, se define como el potencial de membrana al que las dos fuerzas, la química y la eléctrica, se igualan y el sistema llega a un equilibrio donde no hay flujo neto de iones.

$$E_N = 58 \text{ mV} \log \frac{[N]_{\text{fuera}}}{[N]_{\text{dentro}}} \quad \text{a } 25^\circ \text{ C}$$

donde E_N es el potencial de equilibrio para el ión N, y $[N]$ es su concentración.

Tabla 1. Concentraciones de iones dentro y fuera de una célula de mamífero típica y sus respectivos potenciales de equilibrio calculados con la ecuación de Nerst a 25°C

Ion	Concentración extracelular (mM)	Concentración intracelular (mM)	Potencial de equilibrio (mV)
Na^+	145	10	+69
K^+	5	150	-88
Ca^{++}	1	0.0001	+118
Cl^-	110	5	-79

El potencial de reposo proporciona la línea de base sobre la cual actúan todas las señales. Los distintos estímulos abren o cierran diferentes canales iónicos que provocan cambios en el potencial de reposo. Estos cambios originan potenciales de acción y otro tipo de potenciales que constituyen la base de la señalización.

La transmisión de información se codifica en forma de potenciales de acción.

El potencial de acción es una señal eléctrica que puede llevar información visual, de dolor o de contracción de un músculo, el significado de la señal se determina mediante las vías específicas por las que viaja. Su amplitud sigue la ley del todo-o-nada y consiste en la despolarización transitoria de la neurona. Para que una señal tenga significado debe convertirse en potencial de acción. Por lo tanto, los estímulos que provocan despolarización son excitatorios mientras que aquellas que producen hiperpolarización son inhibitorias. Las señales coincidentes en el tiempo y en el espacio se suman y si la despolarización llega a un umbral se dispara un potencial de acción. Todas las señales que no alcanzan el umbral de disparo no producen señal alguna y todas las que lo superan producen la misma respuesta. Lo que determina la intensidad del estímulo es la frecuencia de disparo (código de frecuencia) y el número de neuronas reclutadas (código poblacional).

Además de las células nerviosas las células endocrinas, cardíacas y musculares también son células excitables es decir, disparan potenciales de acción.

El potencial de acción es producido por canales de sodio y potasio activados por voltaje.

El potencial de acción se inicia con la activación de los canales de sodio activados por voltaje. La entrada de sodio al interior celular a favor de su gradiente electroquímico provoca una ligera despolarización que produce la apertura de más canales de sodio, y se genera, por consiguiente, una mayor y más rápida entrada de sodio, que produce una mayor despolarización, y así sucesivamente. Se trata de un fenómeno de retroalimentación positiva. Así se genera la fase ascendente del potencial de acción. En este punto dos factores se añan para llevar el potencial de membrana a su valor de origen (fase de repolarización): la inactivación de los canales de sodio debida a un cambio conformacional en el canal que ocluye el poro y la apertura de los canales de potasio activados por voltaje. Estos canales de potasio responden a cambios en el potencial de membrana de forma análoga a los canales de sodio pero con una cinética más lenta (se les llama canales de potasio retardados). La salida de los iones de potasio hiperpolariza la célula llevándola al potencial de reposo. La repolarización provoca el cierre de los canales de potasio y permite a los canales de sodio inactivados pasar al estado original cerrado pero activable, listos para el siguiente potencial de acción. El potencial de acción viaja a lo largo del axón y se propaga sin detrimento (regenerándose en cada nodo de Ranvier).

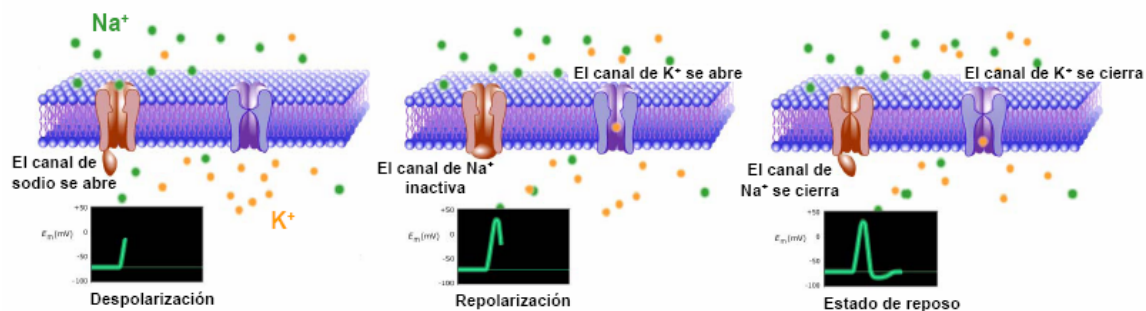


Figura 2. El potencial de acción es la señal eléctrica que utiliza la neurona para mandar información a lo largo del axón. Un estímulo provoca la apertura de los canales de sodio que despolarizan la membrana. Si la despolarización llega al umbral de disparo (~ -55 mV) la neurona dispara un potencial de acción. La inactivación de los canales de sodio y la apertura de los canales de potasio activados por voltaje revierten el potencial de membrana. La apertura de los canales de potasio produce una hiperpolarización que decrece con lentitud, con lo que el potencial de membrana vuelve a su valor de reposo.

La hiperexcitabilidad eléctrica puede deberse a mutaciones que reducen la función de los canales de K⁺.

Los canales de Na⁺ (también los de Ca²⁺ o catiónicos) que provocan la entrada de cargas positivas o la salida de cargas negativas (canales de Cl⁻) producen despolarización, es decir, aumentan la capacidad de la célula de generar un potencial de acción. Sin embargo, los canales de potasio producen hiperpolarización (salen cargas positivas) y actúan por lo tanto como freno de la señalización. Mutaciones que reducen la función de canales de K⁺ provocan hiperexcitabilidad celular, dando lugar a una descarga eléctrica sincronizada. Si la hiperexcitabilidad se localiza en neuronas del sistema nervioso central puede producir epilepsia o arritmia cardíaca si el canal afectado se expresa en el corazón. Hasta la fecha se han identificado diez canalopatías humanas asociadas a mutaciones en canales de K⁺ (Tabla 2).

Tabla 2. Enfermedades humanas asociadas a mutaciones en canales de potasio

Enfermedad	Proteína	Gen	Disfunción
Ataxia episódica (EA-1) y mioquimia	Kv1.1	KCNA1	Hiperexcitabilidad de las neuronas motoras
Síndrome de Andersen; QT largo, parálisis episódica y anomalías esqueléticas	Kir2.1 (I _{K1})	KCNJ2	Hiperexcitabilidad cardíaca
Síndrome Romano Ward; QT largo, recesiva	KCNQ1 (I _{Ks})	KCNQ1	Hiperexcitabilidad cardíaca
	HERG (I _{Kr})	KCNH2	
	KCNE1 (β I _{Ks})	KCNE1	
	KCNE2 (β I _{Kr})	KCNE2	
Muerte súbita en neonatos, QT largo	KCNQ1 (I _{Ks})	KCNQ1	Hiperexcitabilidad cardíaca
	HERG (I _{Kr})	KCNH2	
Síndrome de Jervell y Large-Nielsen, QT largo con sordera, dominante	KCNQ1 (I _{Ks})	KCNQ1	Hiperexcitabilidad cardíaca
	KCNE1 (β I _{Ks})	KCNE1	Defectos en la secreción de K ⁺ en el oído
Fibrilación atrial familiar (AF)	KCNQ1 (I _{Ks})	KCNQ1	Reducción de la duración del potencial de acción y el periodo refractario cardíaco
Síndrome de Bartter tipo II	Kir1.1 (ROMK)	KCNJ1	Desajuste del reciclaje de K ⁺ que reduce la reabsorción renal de Na ⁺
Hipoglucemia hiperinsulinémica persistente	Kir 6.2 (K _{ATP})	KCNJ11	Hipersecreción de insulina
	SUR1 (K _{ATP})	ABCC8	
Diabetes mellitus	Kir 6.2 (K _{ATP})	KCNJ11	Hiposecreción de insulina
BFNC y mioquimia	KCNQ2 (I _M)	KCNQ2	Hiperexcitabilidad en el sistema nervioso central (SNC) y periférico
BFNC	KCNQ3 (I _M)	KCNQ3	Hiperexcitabilidad en el SNC
Sordera dominante	KCNQ4	KCNQ4	Acumulación de K ⁺ y degeneración celular

¿En que puede beneficiar la identificación y el estudio de una mutación en un canal responsable de una enfermedad? Los canales iónicos mutados en enfermedades humanas pueden ser dianas excelentes para la intervención con fármacos, incluso para pacientes en los que la causa de la enfermedad no sea el canal en cuestión. Una prueba de este concepto lo constituye la retigabina, que se encuentra en ensayos clínicos como antiepiléptico (Bialer et al., 1999; Main et al., 2000).

Los cambios en la actividad de los canales pueden no estar asociados con mutaciones en el gen que los codifica, sino que pueden ser debidos a defectos adquiridos como los causados por medicamentos o por causas desconocidas. Recientemente, en un modelo animal de epilepsia del lóbulo temporal (la forma de epilepsia más común en humanos), se ha encontrado defectos no genéticos, sino adquiridos, del canal de potasio tipo A, Kv4.2 (Bernard et al., 2004). La excitabilidad dendrítica de las neuronas de hipocampo de este modelo animal está incrementada y el descenso en la disponibilidad de los canales Kv4.2 contribuye a este fenómeno, debido a una reducción en los niveles de ARNm y un aumento en el grado de fosforilación que provoca un desplazamiento en la apertura hacia voltajes más positivos. Por lo tanto, canalopatías adquiridas aún por descubrir pueden ser el origen de enfermedades humanas más comunes. Además, se cree que polimorfismos en canales de K^+ pueden crear susceptibilidad para desarrollar ciertas patologías como la esquizofrenia (Chandy et al., 1998).

El canal de potasio esta compuesto por el ensamblaje de cuatro subunidades colocadas simétricamente alrededor del poro.

A nivel funcional, en una neurona se pueden distinguir más de ocho tipos de corrientes de potasio, cuatro de calcio y varias de cloro y sodio. Y esto es sólo la punta del iceberg. Se han identificado en la actualidad más de 100 genes que codifican subunidades de canales iónicos. Entre estos, destaca la gran variedad de canales de potasio, con alrededor de 80 genes identificados en humanos que se dividen en al menos cuatro grandes grupos (Figura 3, Gutman et al., 2003). La gran diversidad se refleja en el amplio espectro de funciones fisiológicas que llevan a cabo estas proteínas. Los canales de potasio regulan el potencial de acción y el potencial de membrana de las neuronas, el ritmo cardíaco, el flujo sanguíneo, la secreción de insulina, el transporte epitelial de agua y sales, la diferenciación celular, la respuesta inmune y otras.

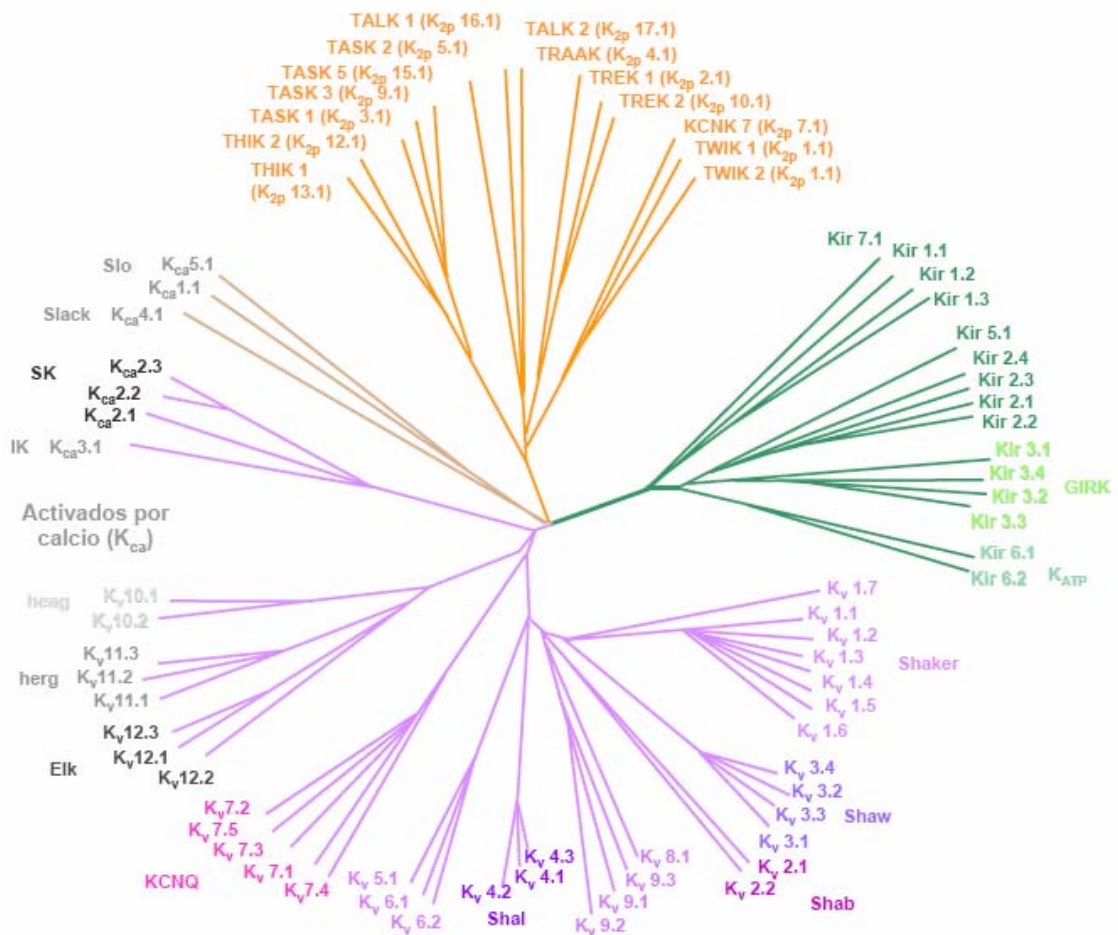
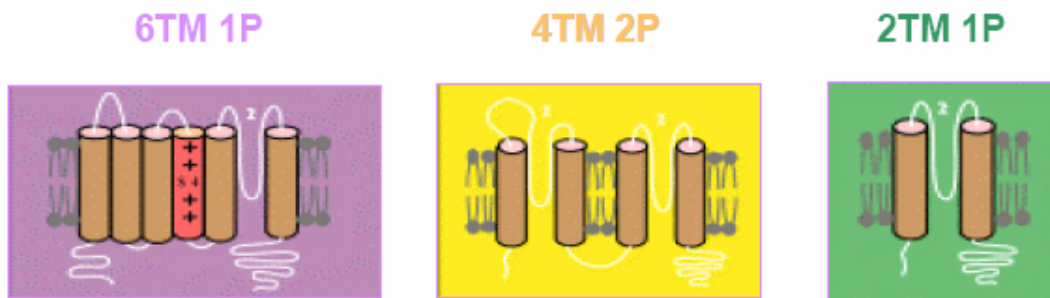


Figura 3. Árbol radial basado en homología de secuencia ilustrando las familias de canales de potasio. El grupo más amplio lo forman los canales con 6TM (en violeta) activados por voltaje (K_v) y activados por Ca^{2+} -calmodulina (K_{ca}). En verde, los rectificadores de entrada (Kir) de 2TM, en naranja los canales de doble poro (K_{2p}) y en marrón los canales activados por Ca^{2+} con 7 TM. Se engloban en color gris los canales activados por Ca^{2+} .

Los canales de K^+ activados por voltaje llamados colectivamente K_v y los canales de K^+ activados por Ca^{2+} -calmodulina, SK y IK (K_{ca}) forman el grupo más amplio y muestra la topología típica de los canales de K^+ . Está compuesto por 6 segmentos transmembranales S1-S6 (6TM) hidrofóbicos que cruzan la membrana en configuración de hélice α , un lazo entre los segmentos S5 y el S6 que forma el poro del canal (P) y extremos intracelulares amino y carboxi terminales. El canal funcional está formado por la asociación de cuatro subunidades 6TM/1P. Los canales de sodio y calcio activados por voltaje están formados por la repetición de cuatro de estos dominios prototipo 6TM en un solo polipéptido.

Con un segmento transmembrana adicional, el grupo 7TM incluye los canales activados directamente por calcio intracelular (K_{ca}) de alta conductancia, Slo. El poro se encuentra entre el S6 y el S7 y difiere de otros canales en que la región N-terminal es extracelular.

La tercera clase de canales está formada por proteínas 2TM, los rectificadores de entrada (K_{ir}), que incluyen los canales de K^+ activados por ATP (K_{ATP}) y los canales acoplados a proteínas G. La región N y C-terminal de estos canales también es intracelular, el poro se localiza entre los dos segmentos transmembranales y el canal funcional es un tetrámero de subunidades 2TM/1P.

La cuarta clase de canales la forman los canales de doble poro con cuatro segmentos transmembrana y el canal funcional es un dímero de subunidades 4TM/2P (K_{2P}). También se han encontrado en levaduras y hongos canales de potasio con dos poros en el mismo polipéptido pero ocho segmentos transmembrana 8TM/2P.

Cada familia se compone de varios integrantes con alta homología. Un canal puede estar formado por subunidades iguales, homoméricos, o varias subunidades de la misma familia pueden ensamblarse formando canales heteroméricos con propiedades que no están presentes en los canales con un único tipo de subunidad.

La subunidad principal que forma el poro de los canales voltaje dependientes, subunidad α , puede asociarse con otras subunidades auxiliares β , que pueden modificar sus propiedades funcionales, su expresión y su localización subcelular (Isom et al., 1994). Los canales $Kv1$ están a menudo asociados a una subunidad auxiliar intracelular $Kv\beta$ ($Kv\beta1-3$, Pongs et al., 1999) que interacciona con el dominio T1 N-terminal formando un tetrámero simétrico (Gulbis et al., 2000). La región N-terminal de la subunidad $Kv\beta$ bloquea el poro de la subunidad α provocando la inactivación del canal (Zhou et al., 2001). Los canales

Kv4 interactúan con las subunidades β KCHIP1-4 (de la familia de sensores de calcio neuronales (An et al., 2000); aumentando la expresión de Kv4 y modificando sus propiedades funcionales. Los Kv7, Kv10 y Kv11 se asocian a diferentes tipos de subunidades auxiliares tipo minK (KCNE). Esta familia de subunidades β tiene un solo segmento transmembranal y pequeños dominios extracelulares e intracelulares (Takumi et al., 1988). Mutaciones en la subunidad auxiliar KCNE1 que se asocia con Kv7.1 (KCNQ1) en el corazón produce el síndrome de onda QT larga (Tabla 2, Abbott et al., 2001). Parece que las subunidades auxiliares tipo minK también pueden asociarse a canales Kv3 y Kv4 (Zhang et al., 2001). Los canales de K^+ activados por Ca^{2+} (K_{ca} 1, 4 y 5) se asocian con una subunidad auxiliar ($K_{ca}\beta$) con dos segmentos transmembranales y regiones N y C-terminal intracelulares. El efecto funcional de esta interacción y su papel fisiológico está siendo actualmente estudiado (Orio et al., 2002). Entre los rectificadores de entrada, la subunidad $K_{ir}6$ que forma los canales K_{ATP} se asocian con receptores de sulfonilurea (SUR) cruciales para el funcionamiento del canal (Inagaki et al., 1995). Las subunidades SUR son miembros de la familia de transportadores ABC que contienen dos sitios de unión a ATP. Acoplan el funcionamiento del canal $K_{ir}6$ al estado metabólico de la célula mediante la unión e hidrólisis del ATP. Esta regulación es crucial en el control de la liberación de insulina de las células β del páncreas. Mutaciones en la subunidad SUR1 provocan hiperinsulinemia familiar (Tabla 2; (Thomas et al., 1995). La subunidad SUR es la diana molecular de bloqueantes de canales K_{ATP} que se usan para aumentar la secreción de insulina en pacientes con diabetes.

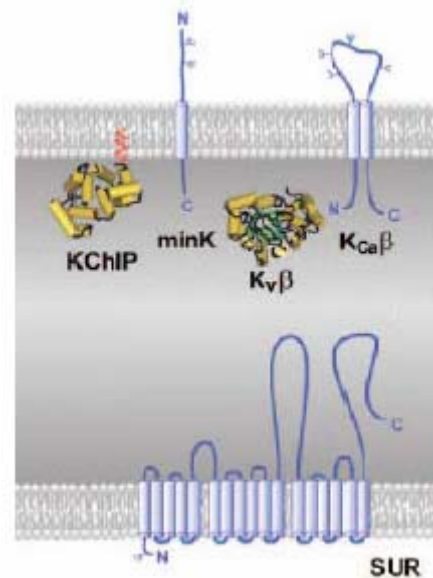


Figura 4. Las subunidades auxiliares se asocian con la subunidad principal (α) modificando sus propiedades.

La selectividad a K^+ se consigue imitando la hidratación de los iones en solución acuosa.

Los canales además de una alta selectividad muestran una velocidad de permeación cercana a la difusión de los iones en solución (10^6 - 10^8 por s). La velocidad y la selectividad son cruciales para las funciones biológicas de la célula. Un típico potencial de acción en una neurona requiere el flujo de miles de iones en un milisegundo. Los canales forman poros de dimensiones definidas que son impermeables a los iones que exceden las dimensiones de la parte más estrecha. Pero ¿cómo evita un canal que por su poro pase otro ión con la misma carga y de menor tamaño? Las moléculas de agua forman pequeños dipolos que interaccionan entre sí y con los iones por medio de puentes de hidrógeno. El ión para permear necesita desprenderse de varias moléculas de agua y este proceso necesita energía. La energía necesaria para la deshidratación la obtiene el ión de su interacción con el poro. En el otro lado del poro el ión recupera su grado de hidratación de tal modo que no hay gasto de energía. Así pues, los iones sodio no pasan por el canal de potasio, pese a ser más pequeños, porque la geometría del poro no proporciona las interacciones necesarias para la pérdida de agua de los iones sodio.

La mayoría del conocimiento que tenemos de la estructura del poro de los canales de K^+ ha sido gracias a la primera imagen atómica de un canal iónico, el canal de potasio bacteriano, **KcsA** (Figura 5, Doyle et al., 1998).

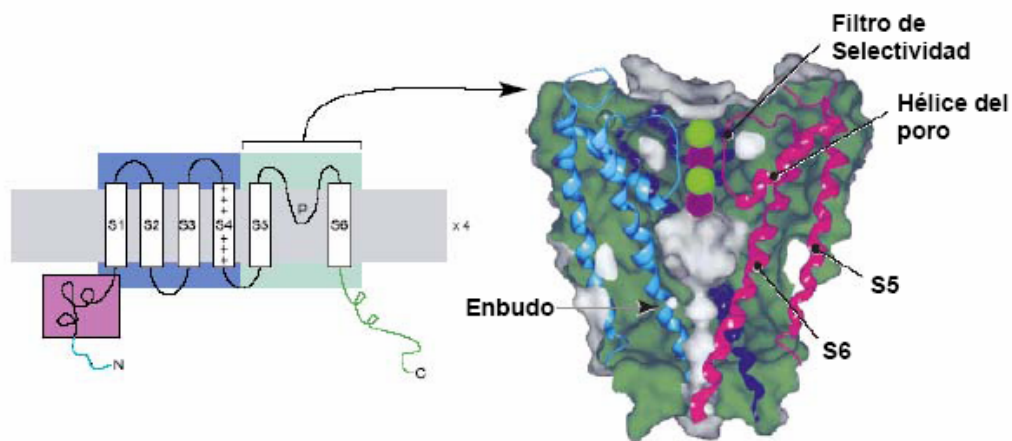


Figura 5. Cuatro subunidades se ensamblan para formar un canal de potasio prototipo. La estructura del poro de KcsA muestra sólo dos subunidades. Los lazos extendidos de las cuatro subunidades forman el filtro de selectividad. Las bolas representan dos iones de K^+ y sus dos posibles posiciones. En el canal cerrado las hélices S6 se cruzan impidiendo el flujo de iones (Doyle et al., 1998).

Cuatro subunidades idénticas forman el canal, cada una presenta dos segmentos transmembrana M1 y M2, unidos por un lazo en forma de horquilla que penetra parcialmente en la membrana formando el poro del canal. En esta horquilla se localiza el **filtro de selectividad**, que alberga la secuencia TVGYG (la secuencia GYG identifica a la práctica totalidad de los canales de K^+). Los oxígenos de los grupos carbonilo de la cadena principal de cada subunidad se dirigen hacia los iones situados en el interior del poro proporcionando a los iones sitios de interacción puntuales. Los iones pasan por el filtro en fila, separados por una molécula de agua y de los cuatro sitios de unión sólo dos son ocupados al mismo tiempo. Cuando el canal está cerrado los iones K^+ se mueven de forma concertada entre dos posiciones y cuando la compuerta se abre un tercer ión desplaza al ión situado al final de la cola (Morais-Cabral et al., 2001). La repulsión electrostática desestabiliza los iones K^+ en el poro haciendo que la unión de los iones al filtro de selectividad no sea demasiado fuerte y promoviendo el flujo a través del poro. Hacia el interior de la membrana se forma una cavidad llena de agua, el vestíbulo interno, que puede albergar un K^+ hidratado. Este ión está estabilizado por los extremos negativos de las cuatro hélices α que rodean el vestíbulo. Curiosamente, el canal de Cl^- también emplea hélices con el extremo cargado positivamente dirigido hacia el centro del poro.

El poro del canal de potasio KcsA en estado cerrado muestra una estructura en forma de embudo.

En el cristal de KcsA en estado cerrado, las hélices posteriores M2 (S6 en los canales 6TM) de cada una de las cuatro subunidades que forman el canal atraviesan la membrana en ángulo, aproximándose unas a otras a medida que se acercan a la región intracelular tras el vestíbulo interno. Este entrecruzamiento forma una constricción suficientemente estrecha como para impedir el paso de iones. ¿Cómo se abre esa “compuerta”? La resolución de la estructura 3D de un canal de potasio bacteriano, MthK, en estado abierto (Jiang et al., 2002) y estudios por mutagénesis (Johnson and Zagotta, 2001) indican la existencia de un mecanismo de apertura similar (Figura 6). El segmento S6 se comporta como un cilindro rígido, salvo en la posición que está ocupada por glicina o alanina que actúa como “bisagra”. El mecanismo de apertura es simple: el cilindro se dobla en este punto, ampliando el diámetro del poro (en MthK el segmento de S6 está doblado). Se piensa que este mecanismo puede ser similar en los canales activados por voltaje de eucariotas (el MthK se activa por Ca^{2+}). Aunque éstos no muestran la “bisagra” de los canales procarióticos, contienen un motivo flexible altamente conservado (PxP o PxG) que

puede servir de bisagra alternativa acoplando la apertura del poro al movimiento del sensor de voltaje en el S4 (del Camino and Yellen, 2001). Probablemente la conductancia del canal depende del tamaño de la apertura de esta compuerta (de la posición de la bisagra), que es independiente del filtro de selectividad.

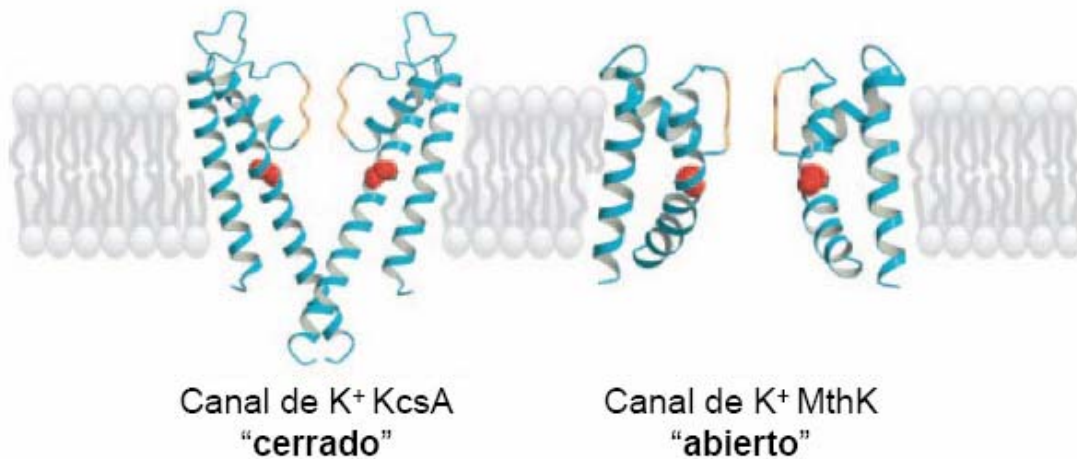


Figura 6. Conformación abierta y cerrada del poro del canal de K⁺. Se muestran dos subunidades del canal de K⁺ bacteriano KcsA (Doyle et al., 1998) representando la conformación "cerrada" y del canal MthK (Jiang et al., 2002) representando la conformación "abierto". Los segmentos M2 (correspondientes a S6) se entrecruzan formando una constricción suficientemente estrecha como para impedir el paso de iones en la estructura de KcsA. El mecanismo de apertura consiste en que el segmento M2 se dobla ampliando el diámetro del poro. Las glicinas conservadas que parecen actuar como bisagra en el segmento M2 se muestran en rojo.

Además de la compuerta de S6 hay otros dos mecanismos de cierre aceptados. Algunos canales de K⁺ dependientes de voltaje muestran mecanismos de inactivación; aunque el estímulo (la despolarización) se mantenga el canal se cierra. La inactivación en el canal de potasio *shaker* se da por un mecanismo de bola y cadena (o inactivación tipo N). Una estructura en el extremo amino terminal forma una bola, unida al resto del canal por un segmento que forma la cadena. Cuando el canal se abre en respuesta al voltaje la bola ocluye el poro, produciendo una corriente transitoria. Otro mecanismo de cierre en los canales voltaje dependientes es la denominada inactivación tipo C (porque era distinta a la N) y parece mediada por movimientos del propio filtro de selectividad. Este proceso de inactivación, más lenta que la N, podría tener como función la regulación de la actividad eléctrica repetitiva y debido a su sensibilidad a [K⁺] extracelular podría determinar una respuesta fisiológica a la acumulación de K⁺.

El sensor de voltaje detecta la diferencia de potencial entre el interior y el exterior de la célula.

La probabilidad de apertura del canal puede estar regulada por diferentes estímulos como cambios en el voltaje, por ligando o por estímulos mecánicos. La apertura de la compuerta S6 está acoplada al movimiento de otras regiones del canal que responden a estas señales celulares. En los canales dependientes de voltaje los cambios en el potencial de membrana son detectados por el segmento S4 y convertidos en fuerza mecánica que abre el poro. En este segmento cada tres residuos hay un aminoácido con carga neta positiva (Arg o Lys). La configuración en hélice α hace que todas las cargas se coloquen al mismo lado de la hélice. El modelo tradicional de movimiento del sensor propone una pequeña rotación del S4 y un desplazamiento hacia arriba en respuesta a la despolarización (como un sacacorchos), que produce una traslocación de cargas y un cambio conformacional que conduce a la apertura del poro (Bezanilla, 2000). El grupo de Roderick Mackinnon ha cristalizado un canal bacteriano de potasio activado por voltaje, KvAP (Jiang et al., 2003) que revela una estructura para el sensor de voltaje sorprendente y controvertida. El grupo de Mackinnon ha propuesto que en reposo S4 forma una pala que se coloca en paralelo a la parte interna de la membrana. Tras una despolarización, las cargas, situadas en el extremo de la pala, se traslocan completamente de la cara interna a la externa de la membrana, atravesando la membrana lipídica. La estructura de la que deriva este modelo está claramente distorsionada y a diferencia del modelo anterior, no puede acomodar un gran acervo de observaciones experimentales.

La reciente estructura cristalina de rayos X del canal de potasio activado por voltaje de mamífero Kv1.2 (Long et al., 2005) cocrystalizado es su conformación abierta con sus subunidades auxiliares ha sido un gran avance en la comprensión de la estructura de los canales voltaje dependientes (Figura 7). En esta estructura se puede ver (a diferencia del cristal de KvAP) la forma en la que los movimientos del detector de voltaje se acoplan al poro. Los segmentos transmembranales S1-S4 forman un complejo que interacciona con la región del poro S5-P-S6 de la subunidad adyacente. Estos dos elementos estructurales interaccionan mediante el conector S4-S5 que se coloca en la cara intracelular del canal. El laboratorio de MacKinnon ahora se dedica a producir cristales de la proteína del canal con el poro en una conformación cerrada.

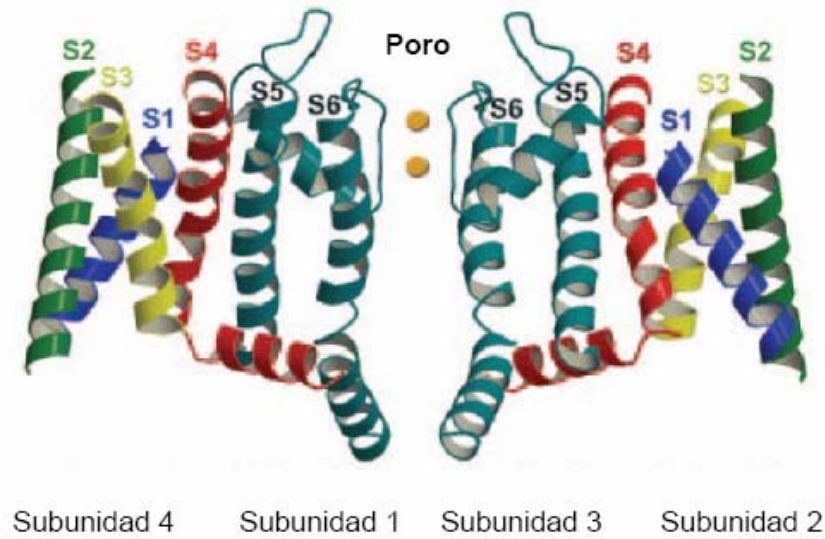


Figura 7. Sección lateral de la estructura tridimensional del canal tetramérico Kv1.2 (Long et al., 2005). En el centro la región del poro S5-P-S6 de dos subunidades, numeradas como subunidad 1 y 3. A la derecha y a la izquierda los segmentos S1-S4 de las subunidades 2 y 4. El dominio que sensa el voltaje compuesto por S1-S4 se coloca para interactuar con la región del poro S5-P-S6 de la subunidad adyacente del tetrámero simétrico.

De los nueve genes de canales de potasio mutados en enfermedades humanas cuatro codifican canales de potasio de la familia KCNQ.

El hecho de que defectos en canales de K⁺ produzcan enfermedades resulta desconcertante dada la gran variedad de canales de K⁺ existentes, poniendo de manifiesto que el dónde, cuándo, cómo y por qué de los canales de K⁺ es muy importante. De hecho, el que algunos canales de potasio no puedan ser reemplazados indica que cumplen necesidades muy específicas.

Los canales de potasio KCNQ son activados por voltaje (K_v7) y como otros canales Kv cuatro subunidades con seis segmentos transmembranales y un poro entre el S5 y el S6 forman el canal funcional. Hasta ahora se han identificado cinco miembros en la familia (KCNQ1-5) y llamativamente mutaciones en cuatro de ellos están asociadas a enfermedades hereditarias humanas (Figura 8).

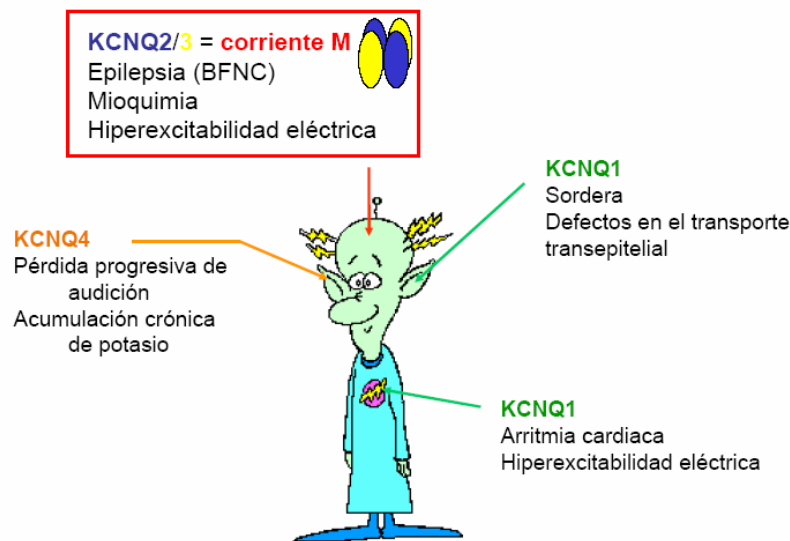


Figura 8. Mutaciones en los genes que codifican los canales de la familia KCNQ producen distintas enfermedades humanas.

La subunidad KCNQ1 repolariza el potencial de acción cardíaco.

El primer canal KCNQ fue clonado en 1996 (se le llamó KvLQT1) como uno de los genes responsables de una forma hereditaria de arritmia cardíaca, el síndrome QT largo (o síndrome Romano-Ward (Wang et al., 1996). En el corazón, **KCNQ1** se ensambla con la subunidad β KCNE1 (minK) para formar la corriente I_{ks} que repolariza el potencial de acción cardíaco (Sanguinetti et al., 1996). La asociación de la subunidad KCNE1 provoca la activación lenta del canal KCNQ1 que repolariza lentamente el potencial de acción cardíaco. Mutaciones en KCNQ1 y KCNE1 prolongan el potencial de acción cardíaco, que se refleja en el intervalo Q-T en el electrocardiograma, provocando arritmia. También permite la secreción transepitelial de K^+ en el oído interno, produciendo sordera cuando la mutación es homocigótica (Síndrome de Jervell y Large-Nielsen, Chouabe et al., 1997). Los canales heteroméricos KCNQ1/KCNE1 muestran mayores corrientes que los KCNQ1 homoméricos y una activación más lenta (Romey et al., 1997). También hay evidencias de que KCNQ1 se asocia con la subunidad β KCNE3 dando lugar a canales constitutivamente abiertos que que reciclan K^+ en el tracto gastrointestinal (Dedek and Waldegger, 2001). El sistema nervioso simpático modula la duración del potencial de acción y en este proceso la corriente I_{ks} juega un papel crucial. Esta regulación empieza por los receptores β -adrenérgicos que elevan los niveles intracelulares de AMPc desencadenando la fosforilación de KCNQ1 por PKA (proteína kinasa dependiente de AMPc) aumentando la corriente. La proteína adaptadora AKAP yotiao forma el

macrocomplejo de señalización uniéndose a la región C-terminal de KCNQ1 y acercando la kinasa PKA y la fosfatasa PP1 que controlan el estado de fosforilación del canal.

Mutaciones en KCNQ4 producen la acumulación de K⁺ en el oído produciendo sordera.

El canal KCNQ4 fue clonado por homología a KCNQ1-3 y localizado en el locus de una sordera dominante progresiva, DFNA2 (Kubisch et al., 1999). KCNQ4 puede formar canales homoméricos tipo M (inhibidos por muscarina), con cinética de activación y desactivación lenta) y también puede formar canales heteroméricos con KCNQ3 en ovocitos de *Xenopus* (Kubisch et al., 1999). La expresión de esta subunidad se localiza predominantemente en la vía auditiva del cerebro y en el oído interno, correlacionando con su papel en sordera (Kharkovets et al., 2000). Datos de Northern blot también revelan expresión débil en el corazón, cerebro y músculo esquelético. Se especula con que el papel de KCNQ4 sea la expulsión de K⁺ en la membrana basal de las células ciliares de la cóclea y que las mutaciones provocan la acumulación de K⁺ en estas células que desencadena la degeneración celular progresiva (Kharkovets et al., 2000).

El papel fisiológico de KCNQ5 sigue siendo enigmático.

La subunidad KCNQ5 fue descubierta en el 2000 por dos grupos independientes y se expresa en amplias regiones del cerebro y en músculo esquelético (Lerche et al., 2000); (Schroeder et al., 2000). También se ha descrito expresión en colon, pulmón y útero (Jensen et al., 2005). Canales funcionales homoméricos KCNQ5 han sido expresados produciendo corrientes que se asemejan a la corriente M. También puede formar canales funcionales heteroméricos con KCNQ3 en el sistema nervioso central y ganglios periféricos (Yus-Nájera et al., 2002). El ensamblaje con KCNQ3 produce un aumento en la corriente y pequeños cambios en la cinética de activación (Lerche et al., 2000). Todavía no se ha encontrado ninguna enfermedad asociada a mutaciones en esta subunidad y aunque parece que forma parte de la corriente M neuronal, los datos de expresión y electrofisiológicos resultan desconcertantes. Las neuronas piramidales de hipocampo se tiñen para subunidades KCNQ5 y sin embargo los datos electrofisiológicos sólo detectan corrientes procedentes de KCNQ5 (resistentes a TEA) en un 30% de las neuronas (Shah et al., 2002). Las neuronas del ganglio superior cervical expresan ARNm de KCNQ5 (además de Q2 y Q3) pero no se registra corriente procedente de esta subunidad (Hadley et al., 2003; Prole and Marrion, 2004).

Mutaciones en las subunidades KCNQ2 y KCNQ3 producen una forma rara de epilepsia.

Aunque hacía tiempo que se sospechaba que defectos en canales de K^+ podrían subyacer ciertas formas de epilepsia, fue en 1998 cuando por fin se demostró este concepto. Investigaciones de disciplinas diferentes convergieron; genéticos buscando la causa de un síndrome epiléptico y electrofisiólogos buscando un mecanismo clave de la excitación en el sistema nervioso. Investigadores en los 60 y 70 describieron familias con un síndrome epiléptico, **convulsiones familiares neonatales benignas** (BFNC, Ronen et al., 1993), con ligamiento al cromosoma 20 (Leppert et al., 1989) y al cromosoma 8 (Lewis et al., 1993; Steinlein et al., 1995). Por otra parte, electrofisiólogos registrando neuronas del ganglio superior cervical descubrieron la **corriente M**, una corriente de potasio (Brown and Adams, 1980). Los investigadores en busca de los genes responsables de BFNC y el canal M convergieron en una sorpresa. Los dos genes BFNC en los cromosomas 20 y 8 codifican subunidades de canales de potasio altamente homólogos, KCNQ2 y KCNQ3 (Charlier et al., 1998; Singh et al., 1998; Biervert et al., 1998).

Estas dos subunidades se asocian para formar canales heteroméricos y constituyen la llamada corriente M neuronal. Los ataques generalizados, recurrentes y breves empiezan alrededor del cuarto día de vida, cesan después de 1-3 meses y los bebés se desarrollan con normalidad. Sin embargo las personas afectadas corren un riesgo de 10-16% de tener epilepsia en la edad adulta. Suele ser provocado por estrés emocional repentino. Una mutación en el sensor de voltaje de KCNQ2 además de epilepsia produce mioquinesia (movimientos involuntarios del músculo esquelético (Dedek et al., 2001). Recientemente también se ha descrito una mutación puntual en la región C-terminal que además de epilepsia se asocian retraso mental (Borgatti et al., 2004). No está claro por qué las mutaciones en KCNQ2 y KCNQ3 provocan convulsiones preferentemente en el periodo neonatal. Las posibilidades incluyen que el cerebro neonatal simplemente tenga el umbral de disparo más bajo o que la expresión de las subunidades esté regulada en el desarrollo. Los niveles de expresión de KCNQ2 y 3 en extractos de cerebro aumentan durante el desarrollo pero KCNQ3 tarda más en alcanzar su máximo (Tinel et al., 1998). Además en estudios en hipocampo de rata parece que los canales KCNQ son el sistema inhibitorio predominante en los primeros días postnatales hasta que la neurotransmisión mediada por GABA cambia de excitatorio a inhibitorio (Okada et al., 2003).

Reducciones modestas en la corriente KCNQ2/KCNQ3 son suficientes para alcanzar niveles epileptogénicos.

Se han descrito alrededor de cuarenta mutaciones en la subunidad KCNQ2 y tres en KCNQ3 que producen BFNC (Figura 9). Estas incluyen mutaciones puntuales, cambios de pauta de lectura, mutaciones de sitios de ajuste, delecciones y truncados. En general las mutaciones se agrupan en el sensor de voltaje, el poro y en la región C-terminal.

Para entender las consecuencias de una mutación hay que tener en mente que los pacientes son heterocigotos y que además las subunidades mutadas pueden coensamblarse con otras subunidades distintas y con subunidades β accesorias. En algunos casos las subunidades mutantes ejercen un efecto funcional dominante negativo que implica que la proteína alterada interfiere con la actividad de la proteína normal.

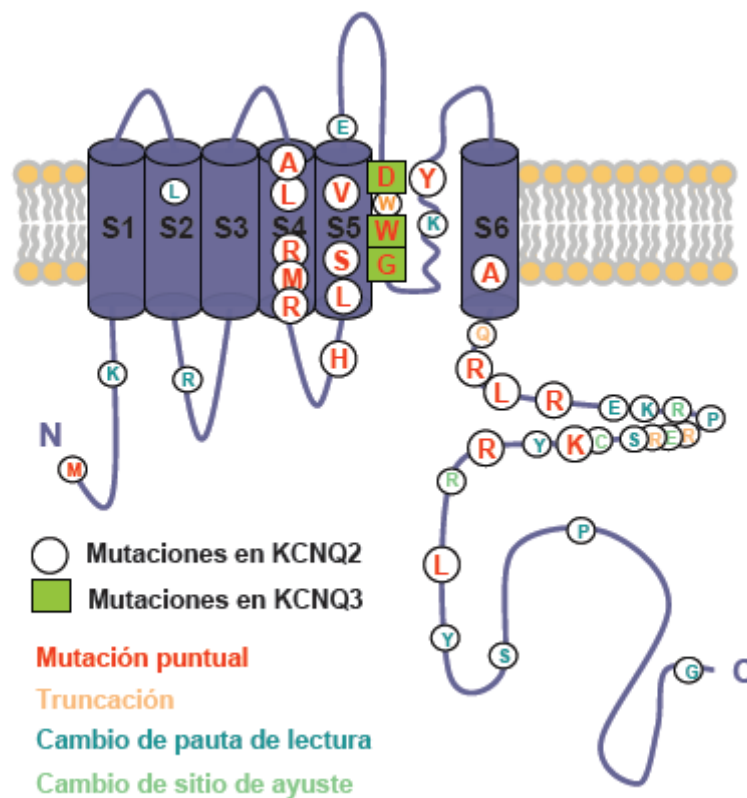


Figura 9. Mutaciones asociadas a BFNC en Q2 (círculo blanco) y Q3 (cuadrado verde) que incluyen mutaciones puntuales, truncaciones, cambios de pauta de lectura y cambios de sitio de ajuste. Las mutaciones se agrupan sobre todo en el sensor de voltaje (S4), en el poro y en la región C-terminal.

La expresión de varios mutantes en ovocitos de *Xenopus* da lugar a corrientes que se reducen alrededor de un 25% (Schroeder et al., 1998). Aunque las mutaciones identificadas están presentes en un solo alelo KCNQ (son genéticamente dominantes), la reducción observada sugiere que los síntomas se deben a la haploinsuficiencia, ya que las mutaciones no ejercen un efecto funcional dominante negativo (definido como una reducción superior al 50%). Por lo tanto, la dependencia de la excitabilidad neuronal con la magnitud total de la actividad de los canales de potasio KCNQ2/KCNQ3 es crítica. Las mutaciones que se localizan en el sensor de voltaje (R207W y R214W) neutralizan un aminoácido cargado positivamente que desplaza la dependencia a voltaje a valores más positivos y provoca cambios cinéticos; la activación es más lenta y la desactivación más rápida (Castaldo et al., 2002; Dedek et al., 2001; Miraglia et al., 2000). Estos cambios provocan que a un potencial de membrana dado, el canal mutado tenga menor corriente que el silvestre.

La asociación de las subunidades KCNQ2 y KCNQ3 produce una potenciación dramática en la corriente.

Las subunidades KCNQ2 y KCNQ3 se expresan sobre todo en sistema nervioso central y periférico, y su patrón de expresión solapa extensamente (Schroeder et al., 1998; Yang et al., 1998; Wang et al., 1998; Cooper et al., 2000). Ambas subunidades pueden ser coimmunoprecipitadas de extractos de cerebro (Cooper et al., 2000; Yus-Nájera et al., 2002) y forman la corriente M neuronal nativa (Wang et al., 1998). La localización subcelular de ambas subunidades sigue un patrón somatodendrítico y se concentran en el segmento inicial del axón y los nodos de Ranvier (Devaux et al., 2004; Pan et al., 2006) donde forman la corriente nodal I_{Ks} (Schwarz et al., 2006). Esta localización viene determinada por la interacción de los canales con ankyrina G y este motivo de unión guarda alta homología con los encontrados en los canales $Na_v\alpha$ que median la misma función (Pan et al., 2006). Ambas subunidades colocalizan extensamente pero a veces sólo se encuentra tinción para KCNQ2 como en las terminaciones sinápticas (Cooper et al., 2000). Las corrientes Q2 homoméricas de sinaptosomas parecen jugar un papel en la regulación de la liberación de neurotransmisor (Martire et al., 2004).

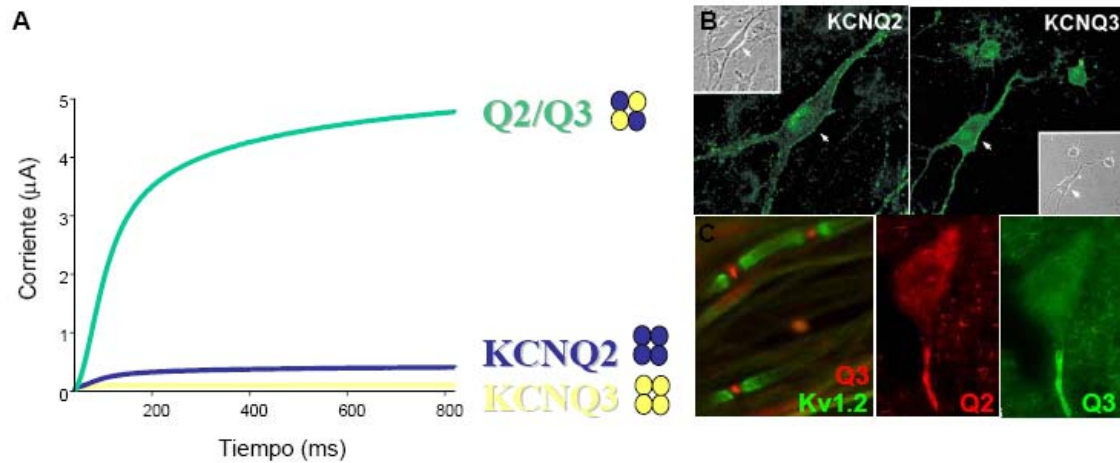


Figura 10. A) Corriente de canales compuestos por subunidades Q3, Q2 y subunidades Q3 y Q2 evocadas mediante un pulso despolarizante de -50 mV a $+50$ mV. **B)** Inmunodetección de las subunidades Q2 y Q3 en neuronas piramidales de hipocampo (Shah et al., 2002). **C)** Localización de Q3 en los Nodos de Ranvier de fibras de nervio ciático flanqueados por Kv1.2 como marcador juxtapanodal y colocalización de Q2 y Q3 el segmento inicial del axón de motoneuronas de la médula espinal (Pan et al., 2006).

Las dos subunidades pueden formar canales homoméricos, pero los niveles de corriente son muy pequeños, sobretodo para KCNQ3. Sin embargo, cuando las dos subunidades se asocian formando canales heteroméricos Q2/Q3 la corriente aumenta unas 10 veces en diferentes sistemas de expresión (Cooper et al., 2000). Se sabe que el número de canales en la membrana aumenta cuando las subunidades KCNQ2 y KCNQ3 son coexpresadas en sistemas heterólogos (Schwake et al., 2000). El hecho de que reducciones pequeñas de corriente sean suficientes para alcanzar niveles epileptogénicos (Schroeder et al., 1998), remarca la importancia fisiológica de mantener la actividad de los estos canales por encima de un umbral funcional. Sin embargo, hasta ahora existe información limitada sobre los mecanismos que regulan los niveles de actividad de los canales KCNQ. El incremento en el número de canales se ve acompañado con un aumento de los niveles de corriente, de forma que se ha sugerido que el aumento en el tráfico de los canales es la base de la potenciación de la corriente. Hemos investigado esta cuestión en detalle y mostramos que al menos existen tres mecanismos en acción. Sorprendentemente el aumento en el número de canales juega un papel secundario.

La corriente M actúa como freno del disparo del potencial de acción.

La corriente M juega un papel central en el control de la excitabilidad neuronal y ese control es afectado por neurotransmisores y neuromoduladores (Marrion, 1997). Es activa en la región de potencial de membrana por debajo del umbral del potencial de acción, limitando la excitabilidad y el disparo repetitivo de potenciales de acción. En respuesta a una inyección de corriente despolarizante, muchas neuronas responden generando un tren de potenciales de acción; si la despolarización se mantiene, sin embargo, la frecuencia de disparo disminuye progresivamente hasta llegar en ocasiones a bloquearse completamente la generación de espigas. A este fenómeno se le denomina adaptación de la frecuencia de disparo. Un mecanismo para producir adaptación de la frecuencia de disparo implica la participación de los canales M. A diferencia del canal de K^+ *shaker*, los canales M se activan muy lentamente y no tienen la estructura amino terminal en forma de bola que ocluye el poro y produce inactivación. Mientras que un único potencial de acción produce la apertura de un número significativo de canales de K^+ , se requieren varios potenciales de acción seguidos para reclutar un número significativo de canales M. Esta apertura retardada provoca un flujo hiperpolarizante de K^+ y ante el mismo estímulo la despolarización es menor y tras un cierto retraso el estímulo no alcanza el umbral de disparo.

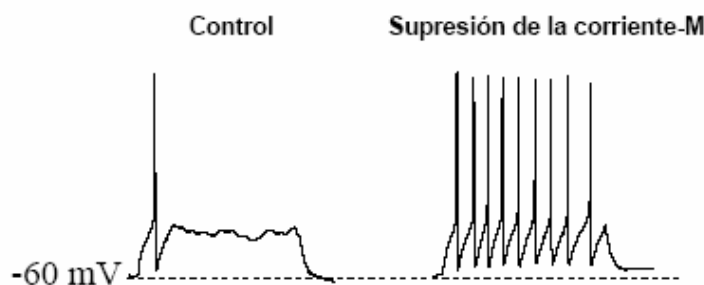


Figura 11. Una neurona simpática que expresa canales M tienden a disparar un solo potencial de acción tras recibir un impulso de excitación. La inhibición de la corriente M provoca que disparen varios potenciales de acción rítmicamente tras el mismo impulso excitatorio.

Se ha descrito esta corriente en una variedad de neuronas de cerebro y de la médula espinal (Brown, 1988), además de en la retina y en músculo liso (Brown and Yu, 2000; Marrion, 1997; Sims et al., 1988). En neuronas del ganglio superior cervical, los canales heteroméricos Q2/Q3 forman el principal componente de la corriente M. Sin embargo, en algunas neuronas piramidales de hipocampo los canales Q3/Q5 o Q5 homoméricos podrían contribuir a esta corriente (Shah et al., 2002; Hadley et al., 2003).

Una intrincada red molecular controla la inhibición de la corriente KCNQ/M.

Los neurotransmisores son la base de la señalización neuronal; deciden qué canales se abren o se cierran y en qué momento. Esta regulación dinámica viene ilustrada por los síntomas episódicos de canalopatías como la epilepsia, que destacan la importancia variable de un canal iónico concreto.

El freno ejercido por la corriente M puede ser relajado por la acetilcolina (ACh) liberada sinápticamente (Villarroel, 1996; Marrion, 1997) facilitando la despolarización de la membrana y la transmisión excitatoria rápida (Brown and Yu, 2000; Marrion, 1997). La ACh actúa sobre la corriente M a través del receptor muscarínico de acetilcolina (a lo que debe su nombre), que es miembro de la gran familia de receptores acoplados a proteínas G.

Todos los sistemas que inhiben la corriente M activan a través de la proteína G trimérica G_q ($G_{\alpha q}$ o $G_{\alpha 11}$) la cascada de la fosfolipasa C (PLC), con la generación de inositol trifosfato (IP_3), liberación de calcio intracelular y activación de la proteína quinasa C (PKC). Sin embargo, la identidad del segundo mensajero que conecta la proteína G con la inhibición de la corriente M ha sido un misterio durante 20 años. Trabajos recientes sugieren que el descenso de los niveles de PIP_2 de la membrana plasmática (la PLC hidroliza el PIP_2) es el principal responsable de la inhibición de la corriente M por muscarina (Figura 12; Suh and Hille, 2002; Suh and Hille, 2002; Zhang et al., 2003; Suh et al., 2004). Además el PIP_2 regula directamente la actividad de los canales KCNQ (Zhang et al., 2003). Sin embargo, la modulación mediada por PIP_2 puede que no sea la historia completa. Recientemente se ha publicado que el efecto inhibitorio de los receptores muscarínicos aumenta por medio de la interacción directa de AKAP150 (el análogo de rata de AKAP79 humano) con KCNQ2 (Hoshi et al., 2003). Este efecto es debido a la fosforilación de KCNQ2 mediada por la proteína quinasa C (PKC) y facilitada por AKAP150. Mediante esta vía de señalización alternativa la estimulación de los receptores muscarínicos de Ach producirían la activación de PKC que fosforilaría KCNQ2 y esta fosforilación puede hacer al canal tres veces más susceptible a la inhibición por PIP_2 (Hoshi et al., 2003). Las dos vías están probablemente interconectadas, ya que la unión de AKAP150 a la membrana está dirigida por PIP_2 (Dell'Acqua et al., 1998) y la PKC es activada por diacilglicerol (DAG) que se produce por la hidrólisis de PIP_2 .

La cascada de señales producida tras la activación del receptor muscarínico genera IP_3 que puede aumentar los niveles de calcio intracelular. El calcio inhibe la corriente M y

por lo tanto ha sido considerado como candidato a segundo mensajero de la inhibición (Marrion, 1997). Sin embargo, la estimulación de receptores muscarínicos en neuronas simpáticas del ganglio superior cervical no eleva el $[Ca^{2+}]_i$ (Cruzblanca et al., 1998). Al contrario, en las mismas células otros receptores acoplados a proteínas G que inhiben la corriente M actúan elevando el calcio intracelular. La habilidad específica de los receptor para aumentar $[Ca^{2+}]_i$ parece ser determinada por la colocación del receptor con receptores IP_3 (Delmas et al., 2002). Receptores de bradiquinina y probablemente los P_2Y inhiben la corriente M mediante señales de calcio sensibles a IP_3 y dicha inhibición está mediada por calmodulina (Figura 12; Cruzblanca et al., 1998; Gamper and Shapiro, 2003). Hay que tener en cuenta que el mismo proceso de hidrólisis de PIP_2 también ocurre tras la estimulación del receptor B_2 pero esto no provoca la depleción del PIP_2 por la resíntesis de PIP_2 dependiente de Ca^{2+} .

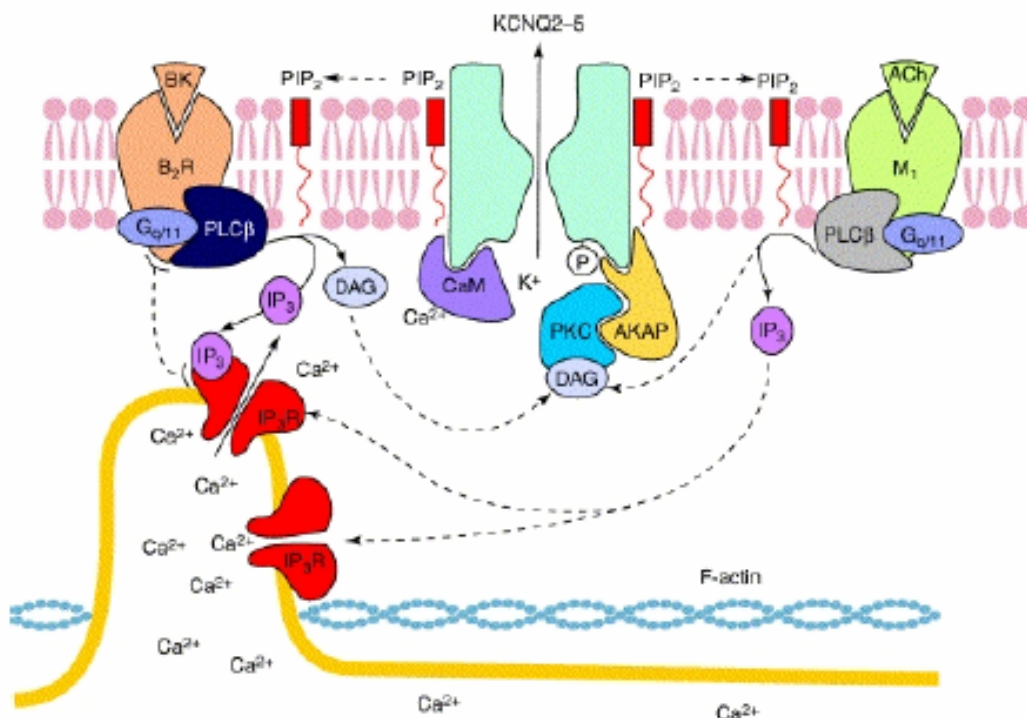


Figura 12. La activación de los receptores muscarínicos M_1 de ACh acoplada a la proteína $G_{q/11}$ estimula la fosfolipasa C ($PLC-\beta$). Esta activación provoca la hidrólisis de PIP_2 produciendo inositol trifosfato (IP_3) difusible y diacilglicerol (DAG) unido a la membrana. IP_3 libera Ca^{2+} del retículo endoplásmico y DAG activa la protein quinasa C (PKC). Sin embargo, es la hidrólisis y depleción de PIP_2 la que suprime la corriente M. La disociación del PIP_2 es facilitada por la activación de la PKC unida a $AKAP$ y la consecuente fosforilación de los canales $KCNQ$. Los receptores de bradiquinina B_2 , acoplados también a proteínas $G_{q/11}$ están próximos a receptores IP_3 en el retículo endoplásmico, asistido por el citoesqueleto de actina. El aumento local de los niveles de IP_3 produce la suficiente liberación de Ca^{2+} para unirse a la calmodulina unida a los $KCNQ$ y cerrar el canal. Las flechas discontinuas indican las rutas hipotéticas (Delmas et al., 2002).

La corriente M además de ser inhibida también puede ser potenciada. Las corrientes de Q2/Q3 pueden ser aumentadas por el incremento de AMP cíclico y este aumento esta mediado por la proteína quinasa A dependiente de AMP cíclico (PKA). Esta activación puede requerir un sitio consenso de fosforilación en la región N-terminal de KCNQ2 (Schroeder et al., 1998). De hecho, la subunidad RIIB de PKA es coinmunoprecipitada con canales Q2/Q3 de extractos de cerebro (Cooper et al., 2000). Sin embargo la regulación por AMP cíclico de la corriente M en el sistema nervioso central no ha sido demostrada.

La región C-terminal del canal es crucial para la interacción con otras proteínas.

Más del 50% de las mutaciones localizadas en BFNC se localizan en la región C-terminal intracelular del la subunidad KCNQ2. El análisis de dicha región revela cuatro segmentos con una elevada probabilidad de formar hélices- α en todos los miembros de la familia, que denominamos hélices A-D. En nuestro laboratorio se encontró la interacción entre calmodulina y los canales KCNQ (Yus-Nájera et al., 2002). La calmodulina (CaM) es una proteína señalizadora intracelular que desempeña un amplio abanico de funciones. Tiene cuatro sitios de unión de alta afinidad para Ca^{2+} , que se denominan manos EF, que cambian de conformación cuando se une el Ca^{2+} . La calmodulina se une a una región C-terminal discontinua que contiene un motivo IQ en la hélice A y dos motivos 1-5-10 en la hélice B (residuos hidrofóbicos clave espaciados). La unión es directa y se da en todos los miembros de la familia (Yus-Nájera et al., 2002). Se ha propuesto que la calmodulina constituye una subunidad esencial para el funcionamiento de los canales KCNQ, basándose en la observación de que canales mutantes que no unen CaM alcanzan la membrana plasmática y sin embargo no son funcionales (Wen and Levitan, 2002). Algunas mutaciones que producen BFNC se localizan en la región de unión a calmodulina pero se desconocen sus consecuencias funcionales.

Como se ha comentado anteriormente, la corriente M es inhibida por el calcio intracelular y dicha inhibición está mediada por calmodulina (Gamper and Shapiro, 2003). La sensibilidad a calcio difiere entre los distintos miembros de la familia y viene determinada por la región C-terminal. La Ca^{2+} /Calmodulina inhibe las corrientes de KCNQ2, KCNQ4 y KCNQ5 pero no las de KCNQ1 y KCNQ3 (Gamper et al., 2005).

La calmodulina también podría estar involucrada en la inhibición de la corriente por la hidrólisis de PIP_2 y facilitada por fosforilación por PKC. Las hélices A y B contienen agrupaciones de residuos básicos, que se cree están involucrados en la unión a PIP_2 . La calmodulina podría abrazar estas dos hélices acercando estas agrupaciones en la estructura terciaria y creando el sitio de unión para PIP_2 . Además, la hélice B contiene múltiples sitios consenso de fosforilación por PKC (S/T-x-R/K). Dicha fosforilación podría afectar la interacción de CaM con el canal. Un ejemplo de mecanismo de competitividad mutua entre PKC y CaM ha sido demostrada para la proteína neurogranina (Chakravarthy et al., 1999).

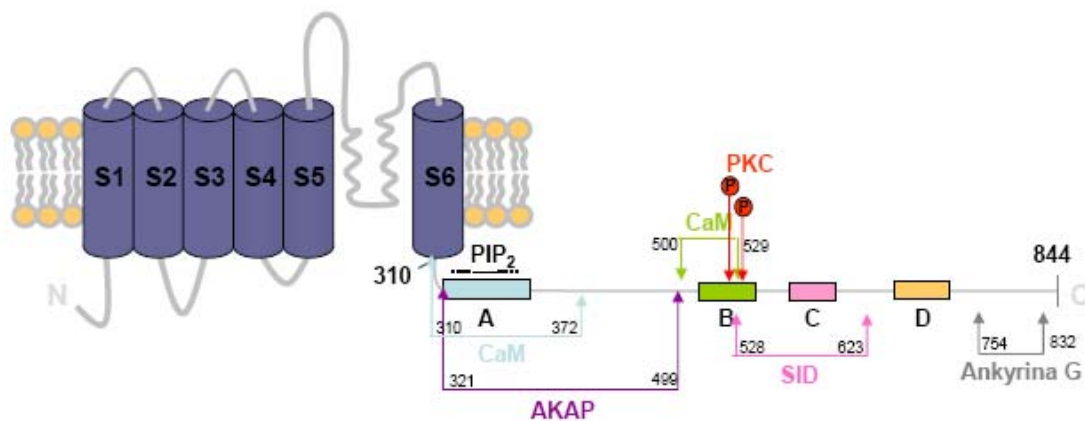


Figura 13. La región C-terminal de KCNQ2 tiene sitios de unión para diversas moléculas reguladoras: calmodulina (CaMI y CaMII representan los dos sitios de unión), PIP_2 y AKAP. Las serinas S523 y S530 son fosforiladas por la PKC unida a AKAP.

Está bien establecido que los complejos de señalización macromoleculares, coordinados por la unión de proteínas adaptadoras, son esenciales para crear microambientes de señalización en canales iónicos capaces de responder con rapidez a la señalización celular. Las moléculas que interactúan y modulan la función de los canales KCNQ podrían formar parte de un macrocomplejo de señalización coordinado por la proteína adaptadora AKAP150 que es capaz de unir PIP_2 , PKC, CaM y PKA. ¿Actúan estas moléculas de forma concertada para modular la función de los canales KCNQ? Se ha descrito una coordinación similar en el canal I_{ks} que está formado por la subunidad α KCNQ1, la reguladora β KCNE1, y la proteína AKAP yotiao, que se une a la región C-terminal de KCNQ1 y que a su vez une PKA y fosfatasa 1 (Marx et al., 2002). La magnitud de la corriente se controla con el estado de fosforilación/desfosforilación de KCNQ1 y también es modulada por PIP_2 (Loussouarn and Escande, 2003).

Dime que canales tienes y te diré quien eres.

Hemos visto que se han identificado alrededor de 80 genes de subunidades de canales de potasio. La subunidad que codifica cada gen puede formar canales por sí mismos, pueden ensamblarse con subunidades de su misma familia o pueden asociarse con proteínas auxiliares que modifican sus propiedades. Si a esto le añadimos que cada gen puede tener variantes por procesamiento alternativo y por retoque “*editing*” del ARN (produce la sustitución de un aminoácido por otro) la variedad de canales posible es enorme. Esta complejidad de canales puede reflejar la diversidad de requerimientos de señalización. Estos requerimientos se ilustran por estudios en las neuronas en el oído interno. Las vibraciones del sonido despolarizan repetitivamente neuronas sensoriales especializadas en la cóclea (llamadas células ciliares), provocando la liberación de neurotransmisor. Las células ciliares que responden óptimamente a diferentes frecuencias del sonido se colocan secuencialmente a lo largo de la cóclea, como las teclas de un piano. La frecuencia óptima a la que se estimulan las células ciliares depende en gran parte de la cinética de los canales de potasio activados por calcio, Slo. El ajuste alternativo provoca la expresión de un gran número de canales Slo distintos con diferentes propiedades cinéticas. Estos canales se expresan diferencialmente a lo largo de la cóclea dando lugar a células que oscilan a diferentes frecuencias. Las reglas que gobiernan la señalización entre neuronas en el sistema nervioso central, aunque se conozca poco, se vislumbra tan compleja como en la cóclea y también puede estar basado en elegir entre el abanico de posibilidades y localizar en la membrana celular los canales con propiedades precisas. Los canales funcionales de una neurona determinarán sus propiedades eléctricas y por lo tanto su forma de responder a las diferentes señales. Estudios en los receptores AMPA han demostrado la conexión entre la densidad de receptores en la membrana sináptica y procesos de memoria y aprendizaje (Carroll et al., 2001).

Las subunidades KCNQ no se ensamblan indiscriminadamente.

Los canales, como la mayoría de las proteínas de membrana, se sintetizan, se pliegan y se ensamblan en el retículo endoplásmico (RE); son procesados a lo largo del aparato de Golgi y son internalizados en vesículas que por último se fusionan con la membrana. Para formar un canal de potasio funcional, cuatro subunidades deben asociarse siguiendo un proceso ordenado, en dímeros de dímeros (Tu and Deutsch, 1999), pero sólo pueden

ensamblarse las subunidades compatibles de una misma familia (Li et al., 1992). En la familia KCNQ, la subunidad KCNQ3 puede ensamblarse con los demás miembros (Q2, Q4 y Q5), pero las demás combinaciones no son posibles y KCNQ1 no puede asociarse con ninguno. Se ha identificado un dominio en la región C-terminal denominado sid (*subunit interaction domain*) que determina la especificidad de subunidad en el ensamblaje de los KCNQ (Schwake et al., 2003). El dominio incluye una región altamente conservada en los miembros de la familia KCNQ, dominio A (Jentsch, 2000) seguido de un segmento de poca homología importante en el ensamblaje de KCNQ1, (Schmitt et al., 2000).

La célula selecciona y localiza en la membrana los canales precisos mediante señales de transporte.

Las subunidades Q2 y Q3 pueden formar canales homoméricos, pero su expresión en superficie es reducida. Sin embargo, la coexpresión de ambas subunidades provoca un aumento del 80% en el número de canales en membrana (Schwake et al., 2000). Neuronas simpáticas del ganglio superior cervical de ratas (P45) expresan canales heteroméricos Q2/Q3 funcionales en la membrana (con estequiometría 2:2), al igual que cuando se expresan ambas subunidades en sistemas de expresión heteróloga (Hadley et al., 2003). Sin embargo, una misma neurona del GSC puede expresar ARN_m de Q2, Q3 y Q5. ¿Cómo decide la maquinaria neuronal que tipo de canales deben expresarse con eficacia en la membrana y cuales no?

El retículo constituye un sistema de control de calidad estricto que reconoce y retiene los canales mal plegados, ensamblados incompletamente o con la composición inadecuada. Señales presentes en la secuencia aminoacídica de los canales de potasio, como las de retención/recuperación, controlan el transporte de los canales a la membrana plasmática (Zerangue et al., 1999). En las células pancreáticas β , el canal K^+_{ATP} , acopla los niveles de glucosa en plasma (por medio del ATP) a la secreción de insulina mediante la despolarización de la célula. El K^+_{ATP} es un octámero formado por cuatro subunidades α Kir 6 (Kir 6.1 o 6.2) y cuatro subunidades β SUR1. Cada subunidad contiene la secuencia -RKR- que retiene en el RE a los canales incompletos. Solo cuando las ocho subunidades se ensamblan se posibilita la expresión en la membrana del complejo (Zerangue et al., 1999). La mutación de esta secuencia permite la expresión en superficie de canales Kir 6 sin SUR. Ilustrando la importancia de la maquinaria de control de calidad, la actividad de estos canales, desacoplada del estado metabólico, reduciría la secreción de insulina provocando diabetes (Gloyn et al., 2004).

Las señales basadas en arginina ($\Phi/\Psi/RRxR$; donde Φ/Ψ representa cualquier residuo aromático o un residuo hidrofóbico voluminoso y X representa cualquier aminoácido) pueden retener a las proteínas en el retículo o pueden “pescarlas” en el aparato de Golgi y devolverlas al retículo (Nufer and Hauri, 2003). El transporte retrógrado está mediado por vesículas revestidas de COPI (*coat protein complex I*) que reconocen las señales de retención/recuperación. (Hardt and Bause, 2002). Pero, ¿cómo se esconde esta señal tras el ensamblaje correcto? El mecanismo más simple que se puede concebir es el enmascaramiento estérico (Letourneur et al., 1995). Los receptores GABA_B ilustran particularmente bien este mecanismo, ya que las regiones C-terminales de las dos subunidades que forman el receptor forman dominios tipo trenza (“*coiled-coil*”) que enmascaran la señal de retención/recuperación presente en una de ellas (Margeta-Mitrovic et al., 2000). La situación en los canales K⁺_{ATP} es más compleja. Las proteínas de la familia 14-3-3 y proteínas con dominios PDZ constituyen un mecanismo de liberación a la retención en el RE. La interacción del canal con estas proteínas parece mutuamente excluyente a la interacción con COPI, facilitando el tráfico a la membrana (O'Kelly et al., 2002). Se ha encontrado que la proteína de la familia 14-3-3 puede interactuar con la subunidad Kir6.2 de los canales K⁺_{ATP} (O'Kelly et al., 2002). Se desconoce si el enmascaramiento estérico de la asociación de las 8 subunidades de este canal es suficiente para la inactivación de la señal de retención/recuperación o si por el contrario es la interacción con 14-3-3 el último responsable de la expresión en superficie del octámero. Para complicar aún más este escenario la eficacia de las señales de retención/recuperación pueden ser reguladas por fosforilación (Scott et al., 2001).

Además de señales que retienen a los canales en el RE, la salida del mismo puede ser facilitada por señales de exportación basadas en residuos negativos (DxE). También se puede controlar el tráfico de los canales en otras etapas diferentes del camino hacia la membrana y su posterior degradación o reciclaje. Para ello, existen señales de transporte entre endosomas y la membrana, señales de endocitosis, señales de transporte a lisosomas, etc.

Drogas moduladoras de canales KCNQ/M han sido propuestas para el tratamiento de la epilepsia, y otras enfermedades neurológicas.

Dada la importancia del control de la corriente M en la excitabilidad neuronal, la disponibilidad de buenos fármacos que la modulen es esencial para la investigación científica sobre el papel de los canales KCNQ/M y también para el posible tratamiento de

enfermedades neurológicas. Moduladores de la corriente M han sido evaluados en investigaciones clínicas; activadores para el tratamiento de la epilepsia y bloqueantes para mejorar el aprendizaje.

Las evidencias genéticas que relacionan reducciones modestas en la función de canales Q2/Q3 a BFNC han provocado interés en los activadores de los canales neuronales KCNQ como agentes antiepilépticos (Wickenden, 2002). La potenciación de la corriente M reduce la actividad epileptogénica en el hipocampo; y previene los efectos tóxicos del glutamato sobre las células neuronales (revisado en (Brown and Yu, 2000)). La retigabina que se encuentra en ensayos clínicos, es uno de estos activadores y actúa desplazando la dependencia de voltaje de Q2/3 a valores más negativos, acelerando la cinética de activación y aumentando la probabilidad de apertura (Tatulian and Brown, 2003). Es admitido que el dolor representa un síndrome de hiperexcitabilidad, por lo que estudios clínicos recientes sugieren que drogas antiepilépticas producen beneficios clínicos en ciertas formas de dolor neuropático. Los canales KCNQ podrían desempeñar un papel importante en la regulación de la codificación sensorial de las neuronas, bajando la excitabilidad y aumentando el umbral del dolor. En ciertos países la flupirtina (análogo estructural de la retigabina), activador de canales KCNQ, está aprobado como analgésico. La retigabina misma ha sido probada como efectiva en modelos de dolor neuropático (Blackburn-Munro and Jensen, 2003). Un activador de canales KCNQ ha mostrado también actividad en un modelo de migraña (Wu and Dworetzky, 2005).

La acción de la acetilcolina en neuronas del sistema nervioso central es de gran interés por su importancia en la atención, la alerta, el aprendizaje y la memoria (Ridley et al., 1986). La linopirdina y su análogo más potente XE991 son inhibidores altamente selectivos de los canales KCNQ/M (Lamas et al., 1997; Brown and Yu, 2000; Robbins, 2001). Investigadores en busca de tratamientos para el Alzheimer han encontrado que la linopirdina mejora el aprendizaje y la memoria en animales de laboratorio, aumentando la liberación de acetilcolina (Coghlan and Carroll, 2001). Otras drogas que aumentan los niveles de Ach están aprobadas y producen efectos significativos en pacientes con Alzheimer. Estos inhibidores de los canales KCNQ pueden crear efectos secundarios derivados de la inhibición de subunidades Q1 o Q4, como la linopirdina que provoca la degeneración de células ciliares de la cóclea lo cual podría producir sordera (Nouvian et al., 2003).

Métodos

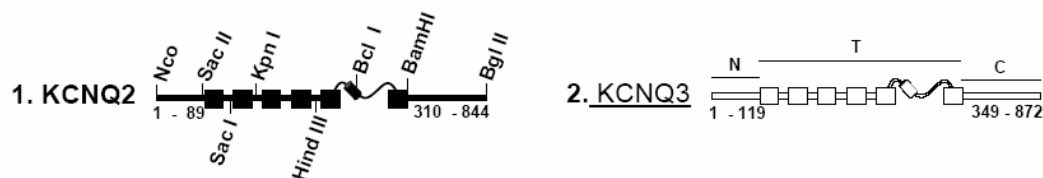


2.1. BIOLOGÍA MOLECULAR

Construcción de quimeras y mutantes

Los ADN complementarios (ADN_c) humanos de los canales KCNQ, KCNQ2 (Y15065) y KCNQ3 (NM004519), se obtuvieron del Prof. Thomas J. Jentsch (ZMNH, Hamburgo). Las construcciones se clonaron en el vector de síntesis de ARN, pSRC5, para expresión en ovocitos de *Xenopus*. Para la expresión en células de mamífero las subunidades Q2 y Q3 fueron clonadas en el vector de expresión pCAGGs y la Calmodulina en pCDN3.1 (ver mapas de vectores en el Anexo 2).

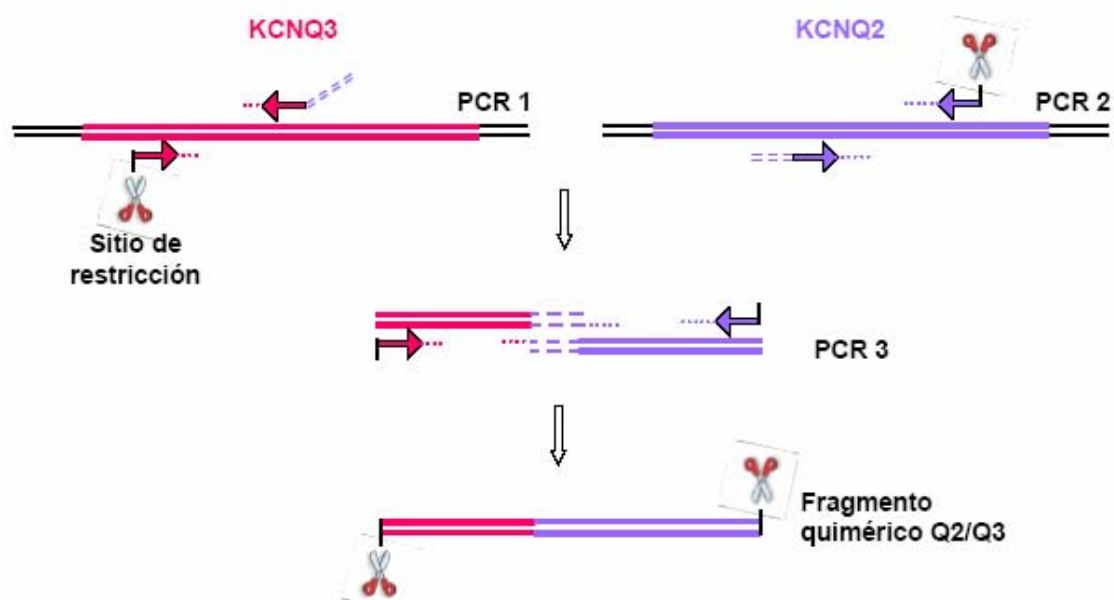
La mayoría de las subunidades quiméricas Q2/Q3 se construyeron intercambiando fragmentos de restricción entre las secuencias de ADN_c de los parentales KCNQ2 y KCNQ3. Para ello se utilizaron algunos sitios de restricción que ya estaban presentes, y otros se introdujeron mediante un método basado en la técnica de PCR para introducir mutaciones puntuales silenciosas en posiciones equivalentes en los ADN_c de las dos subunidades parentales. De esta forma, los sitios de restricción marcaron los límites de los fragmentos intercambiados y dividen las tres regiones principales de las subunidades: N-terminal, transmembrana y C-terminal. Intercambiando estas regiones se generaron las seis quimeras principales Q2/Q3.

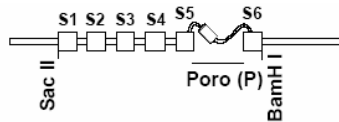


Quimeras	Límites de las regiones	Nº DNA	
3. N3T2C3	<u>M1-R119 Q3</u> <u>G90-A309 Q2</u> <u>G349-1872 Q3</u>	<u>Nco I - Sac II</u> Sac II - BamH I <u>BamH I - Bgl II</u>	# 453
4. N2T2C3	<u>M1-A309 Q2</u> <u>G349-1872 Q3</u>	Nco I - BamH I <u>BamH I - Bgl II</u>	# 454
5. N3T2C2	<u>M1-R119 Q3</u> <u>G90-K844 Q2</u>	<u>Nco I - Sac II</u> Sac II - Bgl II	# 457
6. N2T3C2	<u>M1-R89 Q2</u> <u>G120-A348 Q3</u> <u>G310-K844 Q2</u>	Nco I - SacII <u>Sac II - BamH I</u> BamH I - Bgl II	# 455
7. N3T3C2	<u>M1-A348 Q3</u> <u>G310-K844 Q2</u>	<u>Nco I - BamH I</u> BamH I - Bgl II	# 463
8. N2T3C3	<u>M1-R89 Q2</u> <u>G120-1872 Q3</u>	Nco I - Sac II <u>Sac II - Bgl II</u>	# 447

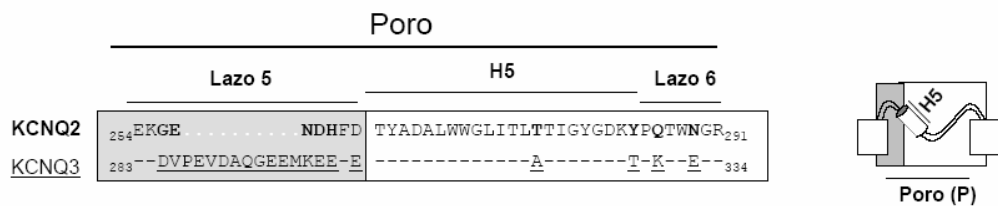
La construcción de algunas quimeras de la región transmembrana y del extremo C-terminal se realizó también intercambiando fragmentos definidos por enzimas de restricción. Cuando esta estrategia no fue posible (sin sitios de restricción presentes en ninguno de los parentales), se realizaron generando fragmentos quiméricos mediante una estrategia basada en la técnica “solapamiento y extensión de la PCR” usando ambas subunidades como moldes. Este método consiste en la generación de fragmentos quiméricos por PCR mediante el uso de cebadores internos híbridos Q2/Q3. Los productos de estas dos PCRs se solapan actuando como moldes de una segunda ronda de PCR. En esta segunda ronda los oligos de los dos extremos contenían sitios de restricción que permitieron la inserción del fragmento quimérico en el canal completo. Los ADN_C quiméricos amplificados fueron completamente secuenciados. En algunos casos, los cebadores híbridos se diseñaron para introducir a su vez mutaciones silenciosas que dieran lugar a sitios de restricción nuevos para ser empleados en la identificación de clones positivos.

Las subunidades etiquetadas con diferentes epítomos se construyeron también mediante la técnica de solapamiento y extensión de la PCR utilizando como moldes un plásmido que contuviera la etiqueta de interés y las subunidades Q2 o Q3. En otros casos, la etiqueta se construyó de novo introduciendo su secuencia en cebadores complementarios.





Quimeras transmembranales	Límites transmembrana	Nº DNA	
9. Q3(S3-S6)Q2	<u>G120-Y184 Q3</u> <u>R155-A309 Q2</u>	<u>Sac II - A97</u> <u>A96 - BamH I</u>	# 503
10. Q3(S5-S6)Q2	<u>G90-W247 Q3</u> <u>K219-A309 Q2</u>	<u>Sac II - Hind III</u> <u>Hind III - BamH I</u>	# 516
11. Q3(P-S6)Q2	<u>K248-L281 Q3</u> <u>A253-G310 Q2</u>	<u>Hind III - A106</u> <u>A105 - BamH I</u>	#548
12. Q3(P)Q2	<u>A253- R291 Q2</u> <u>L331-A348 Q3</u>	<u>A105 - A133</u> <u>A132 - BamH I</u>	# 572
13. Q2 (P-S6)Q3	<u>K219-S247 Q2</u> <u>F277-A348 Q3</u>	<u>Sac II - A104</u> <u>A103-BamH I</u>	# 557
14. Q3(S1-S4)Q2	<u>G90-W218 Q2</u> <u>K248-A348 Q3</u>	<u>Sac II - Hind III</u> <u>Hind III - BamH I</u>	# 515



Quimeras Poro	Límites de la región Q2	Nº DNA
15. T-----Y-K--E	<u>A253-Y284 Q2</u>	<u>A105 - A135</u> # 603
16. T-----T-K--E	<u>A253- T276 Q2</u>	<u>A105 - A115</u> # 598
17. A-----T-K--E	<u>A253-G271 Q2</u>	<u>A105 - Bcl I</u> # 565
18. A-----Y-Q--N	<u>A253-G310 Q2</u> <u>T276A</u>	<u>A105 - BamH I</u> # 582
22. EKDVPEV.....EMKEEFE	<u>T263-R291 Q2</u>	<u>A157 - A131</u> # 706

Quimeras C-terminales		Límites		Nº DNA
20.		<u>P540-S668 Q3</u>	<u>Stu I (A181)- Sal I</u>	#890
21.		<u>P553-H641 Q2</u>	<u>Stu I - Sal I (A184)</u>	#910
Quimeras N-terminales				
24.		M1 - R95 Q4	Nco I - Sac II	#850
25.		M1 - R88 Q4	Nco I - Sac II	#828

La construcción de mutantes puntuales se realizó mediante mutagénesis por PCR. Se diseñaron cebadores específicos conteniendo la mutación que producía el cambio de codón deseado. En los casos que fue posible también se introdujeron mutaciones silenciosas para poder diferenciar fácilmente la secuencia salvaje de la mutada.

Mutantes puntuales		Nº DNA
	<u>KCNQ3 A315T</u>	#730
	<u>KCNQ2 T276A</u>	#769

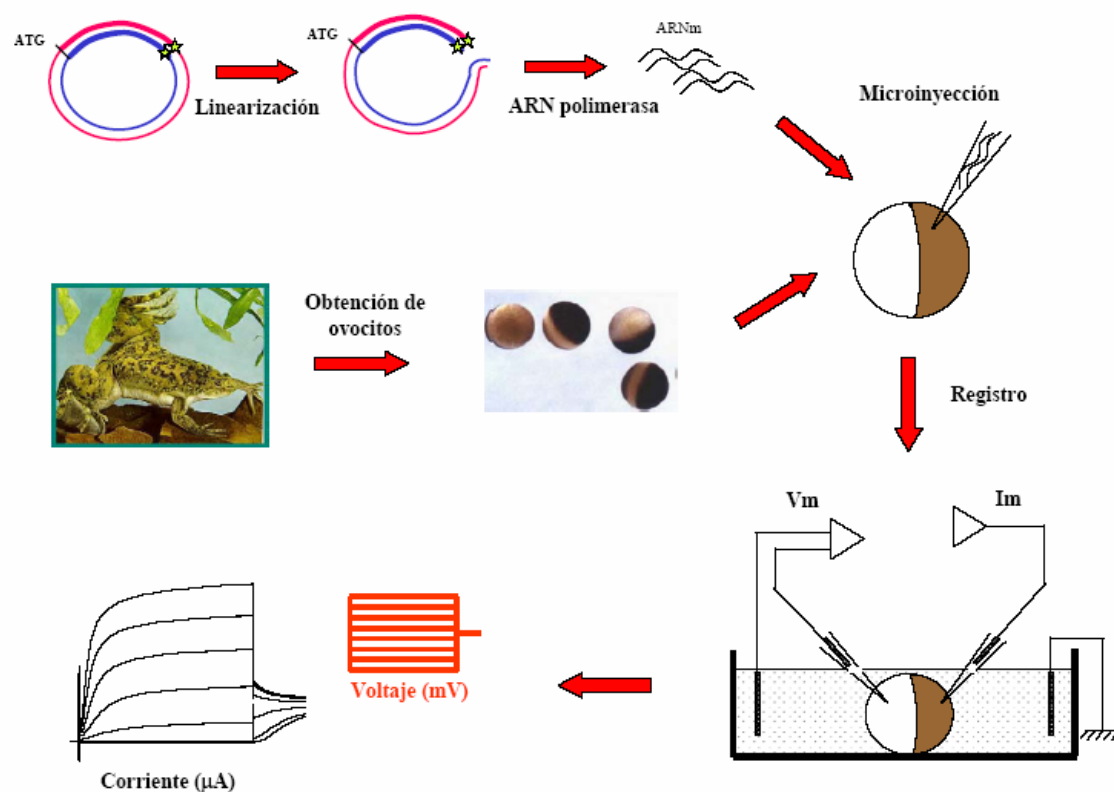
Secuenciación

Los fragmentos de PCR quiméricos o con mutaciones puntuales fueron introducidos en el vector pGEM-TEasy (Promega, ver mapa en Anexo 2) que proporciona un sistema de clonaje directo (sin digestión) de productos de PCR mediante los extremos 3' A protuberantes que dejan algunas polimerasas. Este vector contiene dos promotores (T7 y SP6) que flanquean la PCR clonada y permiten secuenciar el fragmento en las dos direcciones. La secuenciación se llevo a cabo en el servicio de secuenciación del CIB (Centro de Investigaciones Biológicas), CSIC, Madrid.

2.2. EXPRESIÓN EN OVOCITOS DE *XENOPUS LAEVIS*.

El sistema de expresión de ovocitos de *Xenopus* se ha utilizado extensamente para estudiar diversos aspectos de la estructura y la función de canales iónicos y receptores. El ovocito es una célula muy grande (~ 1 mm de diámetro), lo cual facilita su manipulación y contiene muy pocos tipos de canales y receptores endógenos.

El proceso de expresión consta de varias etapas donde se incluye la síntesis del ARN mensajero, la preparación de los ovocitos, la microinyección citoplásmica del ARNm y el posterior estudio de los canales mediante registros electrofisiológicos.



Síntesis de ARN mensajero.

Los canales y las diferentes construcciones se insertaron en el vector pSRC5 desarrollado en el laboratorio. Contiene el promotor T7 para la síntesis de ARNm, la secuencia 5' del gen de la globina de *Xenopus* y la secuencia poliA 3' de SV40 no codificantes para aumentar la estabilidad del ARN mensajero. El ADN plasmídico debe ser linearizado con un enzima de restricción lo más próximo posible del final de la secuencia que se quiere transcribir y se recomienda que sea una enzima de restricción que deje extremos 5' protuberantes (las de extremo protuberante 3' puede dar ARN antisentido, Schendorn and Mierindorf 1985). En nuestro caso el ADN (~ 10 μg) fue linearizado con

ApaL I que se localiza a 600 pb del final del inserto. Tras la purificación del ADN por doble fenolización, se precipitó con isopropanol. Utilizando el ADN lineal como molde (~2 µg) el ARN_m se sintetizó con el kit de transcripción T7 de Ambion (mMESSAGE mMACHINE) 1 h a 37°C. El ARN se precipitó con LiCl y se evaluó su tamaño y su integridad en un gel de agarosa. La concentración y la pureza se determinó mediante espectrofotometría (λ 260/280).

Preparación de ovocitos

Los ovocitos se extrajeron de la cavidad abdominal de las ranas hembras de la especie *Xenopus laevis* anestesiadas con MS-222 (ácido 3-aminobenzoico-etil-éster, SIGMA A-5040) durante 15-30 min. Una capa de células foliculares rodea a los ovocitos, esta capa es una fuente potencial de problemas por lo cual es eliminada. Para ello, se realizó un tratamiento enzimático con colagenasa tipo A (Sigma C-9891) a 1 mg/ml en OR2 sin Ca²⁺ (en mM): NaCl 82.5, KCl 2.5, MgCl₂ 1, HEPES 5, (pH 7.5). Después fueron transferidos a un medio con Ca²⁺, ND96 (en mM): 96 NaCl, 2 KCl, 1.8 CaCl₂, 1 MgCl₂, 5 HEPES, (pH 7.5) suplementado con 100 unidades/ml de penicilina y 0.1 mg/ml de estreptomicina. Los ovocitos más maduros, fases V y VI, y sanos fueron recolectados y mantenidos a 19°C. Tras un periodo de 24 horas, los ovocitos se inyectaron con el ARNm.

Microinyección de ARNm

El ovocito tiene dos hemisferios, un polo animal oscuro y otro polo vegetal claro. Los ovocitos fueron microinyectados con el ARN mensajero en el polo vegetal (en el animal se encuentra el núcleo) utilizando un microinyector Drummond, con 50 nl de solución que contiene aproximadamente 10 ng de ARN mensajero a 0.1 µg/µl de las diferentes construcciones. La cantidad total de ARNm, que determinará la cantidad total de canal expresado, se mantiene siempre constante de forma que cuando se expresan dos subunidades se microinyectaron 5 ng de cada una a 0.2 µg/µl (razón 1:1).

2.3. REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS

Registros de doble electrodo

Este sistema de registro se utiliza para medir la corriente que fluye por la totalidad de los canales presentes en la membrana celular del ovocito. La técnica de fijación de voltaje o “*voltaje-clamp*” de dos electrodos consta de un electrodo para medir voltaje y otro para

inyectar corriente. El sistema consiste en fijar un potencial (comando), el electrodo de voltaje mide el potencial de membrana (V_m) y la diferencia entre ambas se compensa inyectando la corriente necesaria (positiva o negativa) a través del electrodo de corriente. La corriente inyectada refleja el movimiento de iones a través de los canales presentes en el ovocito. Al dar un pulso de voltaje despolarizante los canales de K^+ activados por voltaje se abren y el K^+ sale del ovocito al baño. Para mantener el potencial fijado el sistema inyecta una corriente proporcional a las cargas “fugadas”. Por convenio es positiva cuando cationes fluyen del interior al exterior de la célula y es negativa cuando fluyen hacia dentro. Para aniones una corriente negativa corresponde a la salida de iones al exterior de la célula.

El equipo para adquirir las corrientes macroscópicas está compuesto por un amplificador (GeneClamp 500B) que recibe los datos procedentes de la célula. A su vez, el amplificador envía los datos a una tarjeta convertidora analógico/digital (DIGIDATA 1320A, Axon instruments). La tarjeta es controlada a través de un ordenador que tiene un software diseñado para la realización de los experimentos (pClamp 8.1, Axon). Dicho software permite tanto diseñar los protocolos ejecutados a través del amplificador como analizar los datos recibidos. El ovocito se coloca en una cámara de registro situada en la platina de una lupa. En esta misma cámara se sitúa la entrada del sistema de perfusión por gravedad y los electrodos de la tierra virtual. La perfusión es continua y el líquido que entra por gravedad es retirado por succión.

Para permitir la expresión de los canales los registros electrofisiológicos se realizaron a los tres días de incubación de los ovocitos a 19°C. Las corrientes se obtuvieron mientras los ovocitos se bañaban en “Xenopus saline” compuesta por (en mM): NaCl 100, KCl 2.5, MgCl₂ 1, MnCl₂ 2, HEPES 5 (pH 7.5). Se incluyó Mn²⁺ en lugar de Ca²⁺ para bloquear las corrientes de Ca²⁺ y para prevenir la activación de las corrientes endógenas de Cl⁻ activadas por Ca²⁺. Los electrodos se llenaron con KCl 3M y tuvieron resistencias de ~ 1 MΩ. En algunos casos se registró rompiendo la punta del electrodo para obtener resistencias de ~ 0,2 MΩ y mejorar la fijación de voltaje. Estas puntas se llenaron con agarosa al 1% en KCl 3 M para evitar el intercambio de líquido entre la solución de la pipeta y el ovocito. Las corrientes fueron filtradas a 100 Hz y se adquirieron a una frecuencia de muestreo de 1 KHz. Todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

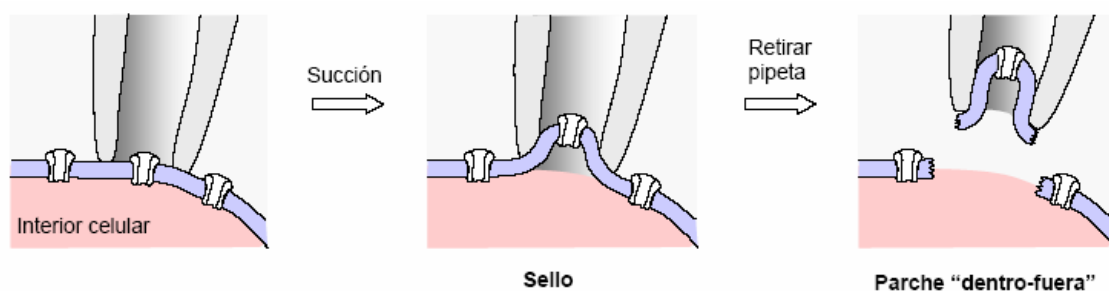
Las medidas de corriente se obtuvieron desde un potencial de reposo de -50 mV mediante pulsos desde -120 mV a +50 mV en incrementos de 10 mV seguidos de un segundo pulso a -20 mV. Las curvas dosis-respuesta de la corriente al bloqueante tetraetilamonio (TEA SIGMA T2265) se obtuvieron con disoluciones de TEA al 0.1, 0.5,

1, 5, 10 y 50 mM (en el caso de corrientes muy insensibles se subió hasta 100 mM la última dosis) preparadas diluyendo en *Xenopus* saline una solución TEA 100 mM (en mM): TEA 100, KCl 2.5, MgCl₂ 1, MnCl₂ 2, HEPES 5 (pH 7.5).

Patch-clamp

Se utilizó la técnica de registro de “patch-clamp”, para registrar sólo unos pocos canales de la membrana de los ovocitos (macroparche) y poder monitorizar el comportamiento de los canales excindiendo el parche y reemplazando la solución del interior celular con la solución del baño.

Para poder registrar en la modalidad de patch-clamp la pipeta de registro debe entrar en contacto íntimo con la membrana, es decir, se tiene que formar un sello de alta resistencia entre la boca de la pipeta y la membrana. El procedimiento comienza por acercar la micropipeta a la membrana de la célula que se desea estudiar. Posteriormente, la micropipeta se presiona contra la membrana y, al aplicarle presión negativa, una pequeña zona de la membrana, o parche, se invagina dentro de la pipeta formándose un sello entre la pipeta y la membrana. La alta resistencia del sello permite realizar registros de los canales que se encuentran en el parche y se llaman registros en configuración de célula adherida. Una vez alcanzada esta configuración, si se retira la pipeta, la membrana se rompe y el parche aislado presenta la cara interna de la membrana plasmática orientada hacia la solución extracelular, es la configuración dentro-fuera o “*inside-out*”.



Con el fin de obtener la máxima estabilidad el microscopio invertido está situado sobre una mesa antivibratoria (Newport). Toda la superficie de la mesa está cubierta por una caja de Faraday la cual se encuentra conectada a la tierra del amplificador de modo que la superficie de la mesa queda aislada de interferencias eléctricas externas. Las respuestas de corriente se supervisaron continuamente en un osciloscopio digital.

Los ovocitos además de la capa de células foliculares están rodeados por la membrana vitelina, una matriz glicoprotéica que le da al ovocito cierta rigidez estructural. Para hacer registros de “patch-clamp” y acceder a la membrana plasmática hay que

eliminar esta capa con unas pinzas. La visualización de la membrana vitelina se facilita colocando el ovocito en un medio hipertónico (200 mM K-aspartato, 20 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 10 mM HEPES-KOH pH 7.4). Los ovocitos desprovistos de esta membrana son muy frágiles y si entran en contacto con el aire se rompen.

Los registros se realizaron en la configuración de célula adherida y en parche escindido “dentro-fuera” con un amplificador EPC8 (HEKA). La solución de la pipeta fue en mM: NaCl 100, KCl 2.5, MgCl₂ 1, MnCl₂ 2, HEPES 5 (pH 7.5) y la solución del baño en mM: 96 KCl, 5 EDTA, 10 HEPES pH 7.4. Una vez escindido el parche la solución se cambió a en mM: KCl 60, EGTA 5, KF 5, Na₃VO₄ 0,1, K₄P₂O₇ 10, HEPES 10 pH 7.4. Las corrientes se filtraron a 1 KHz y se adquirieron a una frecuencia de muestreo de 5 KHz.

Los niveles de corriente antes y después de escindir el parche fueron monitorizados mediante pulsos de -100 mV a +60 mV de 1 s cada 4 s.

Análisis de datos

Las respuestas electrofisiológicas adquiridas se analizaron con el programa Clampfit 8 (Axon instruments, USA), la representación y el ajuste de funciones a los datos se realizó con Sigmaplot y el análisis matemático de los datos con Excel.

Las **medidas de corriente** se obtuvieron mediante pulsos de voltaje de -120 mV a +50 mV en incrementos de 10 mV seguidos de un segundo pulso a -20 mV. La corriente de cola obtenida (el pulso de -20 mV) se representó frente al voltaje del primer pulso y se realizó un ajuste mediante la ecuación de **Boltzmann**.

$$I = \frac{I_{\max}}{1 + \exp\left[\frac{V_{1/2} - V_m}{S}\right]}$$

donde I es la corriente de cola (-20 mV) y I_{max} la corriente máxima alcanzada

V_m representa el potencial de membrana (pulso)

S es el inverso de la pendiente en el punto de inflexión. Proporciona una indicación del número de cargas equivalentes que se mueven en el campo eléctrico para abrir la compuerta.

V_{1/2} el voltaje al cual se alcanza el 50 % de la corriente máxima

Los parámetros que se obtuvieron de la ecuación de Boltzmann son la corriente máxima (I_{max}), la V_{1/2} y la pendiente (S). Tomando como medida de corriente la I_{max} el

análisis no varía por cambios en la sensibilidad a voltaje que pudieran mostrar los canales quiméricos o los diferentes mutantes.

La corriente obtenida depende entre otras cosas de la fuerza electromotriz del K^+ ($V_m - V_{rev}$). Siendo V_m el voltaje de la membrana y V_{rev} el potencial de reversión, voltaje al cual la corriente pasa de fluir hacia dentro a fluir hacia fuera. Para un canal selectivo el potencial de reversión es igual que el potencial de Nerst (E_N) para el ión permeante. Para eliminar las variaciones en la fuerza electromotriz (debidas por ejemplo a cambios en la concentración de K^+ del baño o medidas erróneas de potencial) se calculó el potencial de reversión en cada registro (de cada ovocito) y se dividió la I_{max} por la fuerza electromotriz, el producto del cálculo es la conductancia máxima (G_{max}). Los datos se muestran como medias de $G_{max} \pm$ su error estándar para un determinado número de experimentos. Las diferencias se evaluaron estadísticamente con el test de la t Student ($p < 0.05$).

La **sensibilidad al bloqueante TEA** de los canales se ha expresado en valores de IC_{50} , que representa la concentración de TEA necesaria (en mM) para bloquear la mitad de la corriente. La corriente fue activada con pulsos de -20 a +40 mV y se aplicaron soluciones con concentraciones de TEA crecientes. El valor de IC_{50} se obtuvo de la representación de la inhibición de la corriente frente a las diferentes concentraciones de TEA aplicadas, ajustada con la ecuación de **Hill**,

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{[TEA]^h}{IC_{50}^h + [TEA]^h}$$

donde [TEA] es la concentración de TEA aplicada

IC_{50} es la concentración de TEA a la cual se observa un 50% de inhibición y refleja la afinidad del ligando por el receptor.

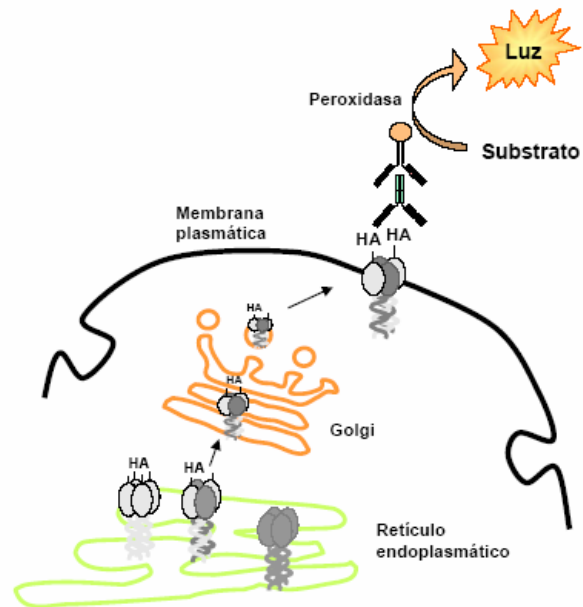
h es el coeficiente de Hill y proporciona una estimación de los sitios de unión.

2.4. EXPRESIÓN EN SUPERFICIE

Para estimar el número de canales en la membrana de los ovocitos se siguió el método descrito por (Schwake et al., 2000), que utiliza la subunidad KCNQ3 etiquetada con el epítipo HA (YPYDVPDYA) en el lazo extracelular que conecta el segmento transmembranal S1 y S2 (amablemente proporcionado por el Dr. Jentsch). Los ovocitos fueron inyectados con ~20 ng de una mezcla de ARNm 1:1 que contenía ~10 ng de Q3-

HA. Los ovocitos no inyectados desprovistos de epítomos HA fueron utilizados como control negativo. Se inyectaron unos 30 ovocitos por grupo experimental.

Tras 3 días a 19°C los ovocitos de sometieron a la inmunodetección de los canales presentes en la membrana. Durante todo el proceso los ovocitos se mantuvieron a 4°C para evitar la endocitosis. Los ovocitos se bloquearon durante 30 minutos en ND96 al 1% de BSA (Albúmina bovina SIGMA A4503) y se incubaron con el anticuerpo primario anti-HA de rata (3F10 Roche Diagnostics) a 1 µg/ml (1:100 de una solución madre a 0.1 mg/ml) en ND96-



1% BSA 1 h. Después de 3 lavados de 10 min con ND96-1% BSA se incubaron con el anticuerpo secundario anti-rata conjugado con peroxidasa a 1.6 µg/ml (1:250 de una preparación madre a 0.4 mg/ml goat anti rat, Jackson Inmunoresearch) durante 1 h. Después se realizaron tres lavados de 10-15 minutos con ND96-1% BSA y otros 4 lavados con ND96 para eliminar el BSA (el BSA da señal de fondo). Se añadió 50 µl de la solución sustrato de la peroxidasa (Supersignal ELISA Femto Maximun Sensitivity de Pierce) y la señal de luminiscencia se midió en un luminómetro de tubos Sirius (Berthold) o en un luminómetro de placas Synergy HT (Biotek). Las unidades relativas de luz se contaron durante 15 s inmediatamente después de añadir el sustrato.

2.5. EXPRESIÓN EN CÉLULAS DE MAMÍFERO.

Para los experimentos bioquímicos los canales fueron expresados en la línea celular HEK293T que proviene de células embrionarias de riñón humano. Esta línea celular se creció en DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium) suplementado con suero fetal bovino al 10 % (GIBCO-BRL) y aminoácidos esenciales al 10 % y se mantuvieron en el incubador humidificado a 37°C y 5% de CO₂.

Para la inmunodetección de los canales se utilizó la subunidad KCNQ2 etiquetada en el extremo N-terminal con 5myc (5 x MEQKLISEEDLN) y la KCNQ3 con 2HA (2 x YPYDVPDYA) también en el extremo N-terminal. Todas las construcciones expresadas

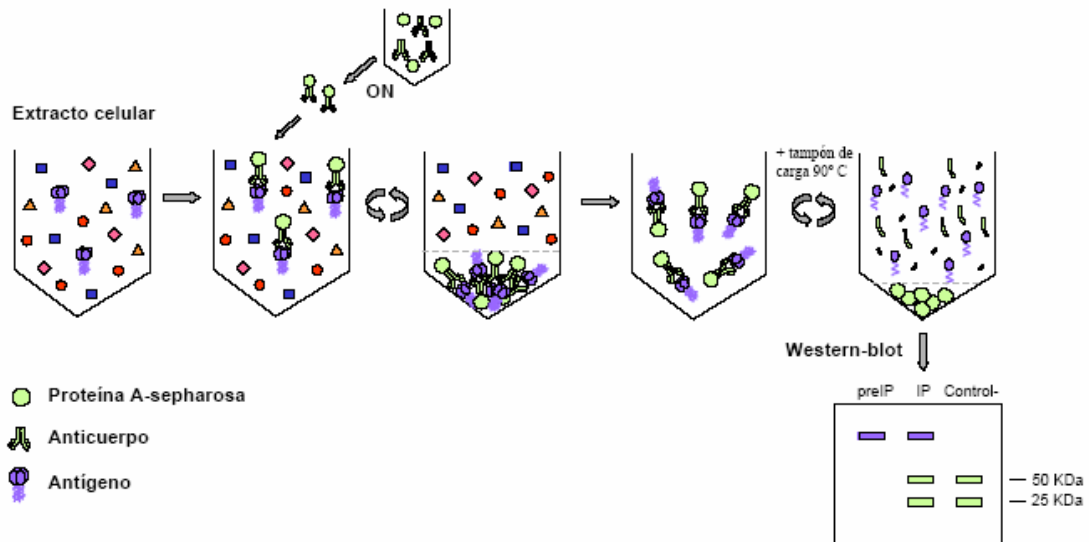
se clonaron en el vector de expresión pCAGGs, que proporciona altos niveles de proteína, excepto la calmodulina etiquetada con YFP en el N-terminal que se encontraba en el vector pCDNA3.1. La línea celular HEK293T posee el antígeno T del virus SV40, de manera que son capaces de producir muchas copias de los plásmidos que posean el origen de replicación del virus (como pCDNA3, pEGFP y similares)

Las células HEK293T fueron transfectadas transitoriamente con el método de fosfato cálcico. Las células se sembraron en una placa T75 y cuando alcanzaron una confluencia del ~50% se les añadió 1 ml de precipitado de fosfato cálcico con ~10 µg de ADN total, 10 µg de canal (Q2 o Q2/Q3) o 5 µg de canal + 5 µg de CaM. El ADN se añadió a 500 µl de CaCl₂ 250 mM y a su vez a 500 µl de HBS (50 mM HEPES, 1.5 mM Na₂HPO₄, 140 mM NaCl pH 7.05). La mezcla se incubó a temperatura ambiente 1 minuto y se añadió a las células. El periodo de expresión fue de 24 h y la eficiencia de la transfección se evaluó mediante la visualización del fluoróforo YFP unido a la calmodulina. Las células se recogieron con un rascador en 1 ml de tampón PBS y fueron congeladas a -80°C.

Inmunoprecipitación

Se expresaron subunidades Myc-KCNQ2, HA-KCNQ3 y YFP-calmodulina en células HEK293T y la interacción de calmodulina con el canal fue evaluada inmunoprecipitando la subunidad KCNQ2.

En la inmunoprecipitación las proteínas de la célula son solubilizadas por acción de detergentes que mantengan las interacciones que se quieran estudiar. Los anticuerpos se añaden a los lisados celulares donde se forman los complejos antígeno-anticuerpo. Estos complejos son precipitados por una fase sólida formada por proteína A unida a sepharosa. La proteína A, de la superficie de *Staphylococcus aureus*, tiene gran afinidad por el fragmento Fc de las IgG. Una vez sedimentados por centrifugación los complejos se lavan y se resuspenden en tampón de carga desnaturizante para su análisis en SDS-PAGE.



Primero se unió el anticuerpo para inmunoprecipitar, anti-myc, a la proteína A-sepharosa (SIGMA P3391) durante toda la noche. Para ello, la proteína A-sepharosa se equilibró con tampón IPP500 (10 mM Tris/HCl pH 8, 500 mM NaCl, 0.1% Tritón X-100, 0.1% Tween 20, 0.2% BSA, cocktail Complete de Roche 1X), lavándola 3 veces y dejándola diluida al 50% en IPP500. Se incubó 40 μ l de proteína A equilibrada (4% final) en 500 μ l de IPP500 con 2 μ l de anticuerpo anti-myc (1:250) ON a 4 °C en una noria para evitar la sedimentación de la proteína A.

Al día siguiente se preparó el extracto celular. Se descongelaron las células almacenadas a -80°C y se solubilizaron en 400 μ l de tampón IP (50 mM Tris/HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 5 mM EGTA, 1% Tritón X-100, Complete 1X) durante 30 min a 4°C. Tras una centrifugación previa a 500 g 3 min para eliminar los núcleos se eliminó la parte insoluble mediante una centrifugación a 11.000 g 20 min. Una parte del extracto (60 μ l) se separó como muestra anterior a la inmunoprecipitación (preIP) añadiéndole buffer de carga y guardándola a -20°C. El resto fue utilizado para la inmunoprecipitación. En algunos casos la cantidad total de proteína se midió empleando el método de Bradford.

Para eliminar las uniones inespecíficas del extracto a la proteína A-sepharosa, se preclareó el extracto antes de la inmunoprecipitación. El extracto se incubó con proteína A sin anti-myc unido (30 μ l proteína A + extracto 340 μ l + 160 μ l de tampón IP + 0.2% BSA) durante 1 h a 4°C. La proteína A se eliminó mediante un pulso a 5000 g y se recogió el sobrenadante que correspondía al extracto preclareado.

La proteína A incubada con anti-myc durante toda la noche se lavó tres veces con tampón IPP100 (10 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 0.1% Tritón X-100, 0.1% Tween 20, 5 mM EGTA), y se le añadió el extracto preclareado para inmunoprecipitar la subunidad KCNQ2 etiquetada con myc. Se incubó durante 4 h a 4°C en una noria. La proteína A se sedimentó mediante un pulso a 5.000 g arrastrando el complejo unido al anti-myc. El sobrenadante que corresponde a las proteínas del extracto que no han sido inmunoprecipitadas se guardó como muestra postIP.

Para finalizar, la proteína A sedimentada se lavó con tampón IP cuatro veces incubando cada lavado 5 min y se le añadió 15 µl de tampón de carga para su posterior análisis por western blot.

Western blot

Las subunidades KCNQ2 y KCNQ3 (~100 KDa) se resolvieron en condiciones desnaturalizantes empleando geles al 8% (0.75 mm de espesor) de SDS-poliacrilamida (Arcrilamida/bis 30%; Mini-Protean II Bio-Rad) en tampón de electroforesis Tris-glicina (Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0.1%). Se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Protran, Schleicher & Schuell) en 25 min a 100 V en tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0.1%, 20% metanol). La membrana se bloqueó con leche en polvo al 5% (Nestle) en PBS al 0.2% de Tween 20 (PBT 0.2%) durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se incubó con el anticuerpo anti-myc de ratón (9E10) o anti-HA de rata (3F10), 1:1.000 en solución de bloqueo, durante 1 hora. Las membranas se lavaron durante 10 min 3 veces con PBT y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón HRP (1:5000 en PBT) o anti-rata HRP (1:5000 en PBT) durante 30 min. Tras lavar durante 30 min (cambiandola cada 10 min) con PBT se revelaron con ECL (ECL1 + ECL2 1:1; ECL1: 100mM Tris-HCl pH 8.5, 40 µM Coumárico, 250 µM luminol; ECL2: 100mM Tris-HCl pH 8.5, 60 µl H₂O₂ 30%).

La calmodulina endógena (20 KDa) se resolvió en geles al 15% con EGTA (5 mM). La transferencia se realizó a 200 mA 40 min a membranas de nitrocelulosa con tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0.1%, 20% metanol). Las membranas se bloquearon con BSA al 3% en PBT 1 h y leche al 5% en PBT 30 min. El anticuerpo anti-CaM de ratón (Upstate) se utilizó a 1:2.000 en PBT con BSA al 0.2% 1 hora. Las membranas se lavaron con PBT 30 min (3 lavados de 10 min) y se rebloqueó la membrana con BSA al 3% en PBT 30 min. Después se incubó con el anticuerpo secundario anti-ratón HRP (1:5.000 en PBT) durante 30 min y se reveló tras lavar durante 1 hora con PBT.

La calmodulina etiquetada (YFP-CaM) de 48 KDa se separó en geles al 8% con EGTA (5 mM). Se transfirió a membranas de nitrocelulosa a 200 mA 25 min en tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0.1%, 20% metanol). La inmunodetección se hizo como se ha descrito para la CaM endógena.

Para evaluar los niveles de proteína se utilizó como control interno la α -tubulina (~50 KDa). La detección del canal y de la tubulina se llevó a cabo en un mismo gel al 8% y se transfirió a membranas de PVDF (Immobilon-P, Millipore) en 1 hora a 400 mA en tampón de transferencia (Tris 50 mM, glicina 40 mM, SDS 0.033%, 20% metanol). La membrana se bloqueó con leche en polvo al 5% en PBT 1 hora y se incubó simultáneamente con el anticuerpo anti-myc (1:1.000) y anti-tubulina (1:15.000) ambas de ratón en solución de bloqueo 1 h. El resto del proceso fue como en los casos anteriores.

Las imágenes de las autoradiografías se digitalizaron en un densitómetro GS 800 (Biorad) y la cuantificación se realizó con el programa Quantity one (BioRad).

Anticuerpos

Anti-HA (1:1.000): anticuerpo monoclonal de rata 3F10 de Roche diagnostics (1 867 423).

Anti-myc (1:1.000): anticuerpo policlonal de conejo 9E10 (ascites) cedido por Sebastián Pons (Instituto Cajal).

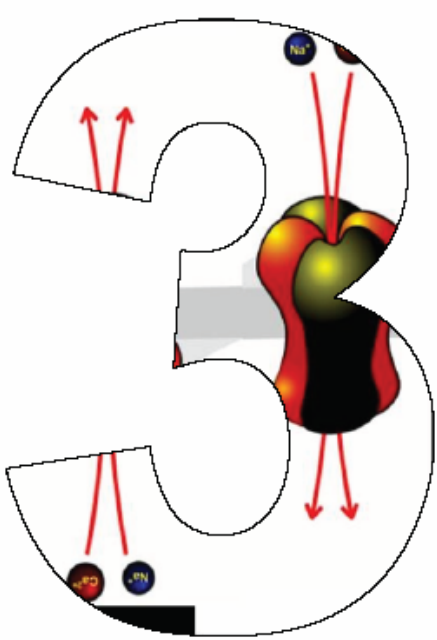
Anti-CaM (1:2.000): anticuerpo monoclonal de ratón de Upstate Biotechnology (05-173).

Anti- α -tubulina (1:15.000): anticuerpo monoclonal de ratón DM1A de SIGMA (T6199).

Anti-Mouse HRP (1:5.000): anticuerpo anti ratón IgG conjugado a peroxidasa de BioRad.

Anti-rat HRP (1:5.000): fragmento F(ab')₂ anti rata de cabra IgG de Jackson ImmunoResearch.

Resultados



3.1 MECANISMOS MOLECULARES DE LA POTENCIACIÓN DE CANALES Q2/Q3

La región transmembranal de KCNQ2 es necesaria para aumentar la corriente de Q3.

Cuando las subunidades KCNQ2 (**Q2**) y KCNQ3 (**Q3**) forman heterómeros se observa un aumento en corriente en diferentes sistemas de expresión (Wang et al., 1998; Selyanko et al., 2001). Este aumento es particularmente dramático en ovocitos de *Xenopus*, cuando se expresan las subunidades **Q2** o **Q3** solas se obtienen corrientes muy pequeñas, sin embargo al coexpresarlas la corriente aumenta unas 10 veces (figura 1).

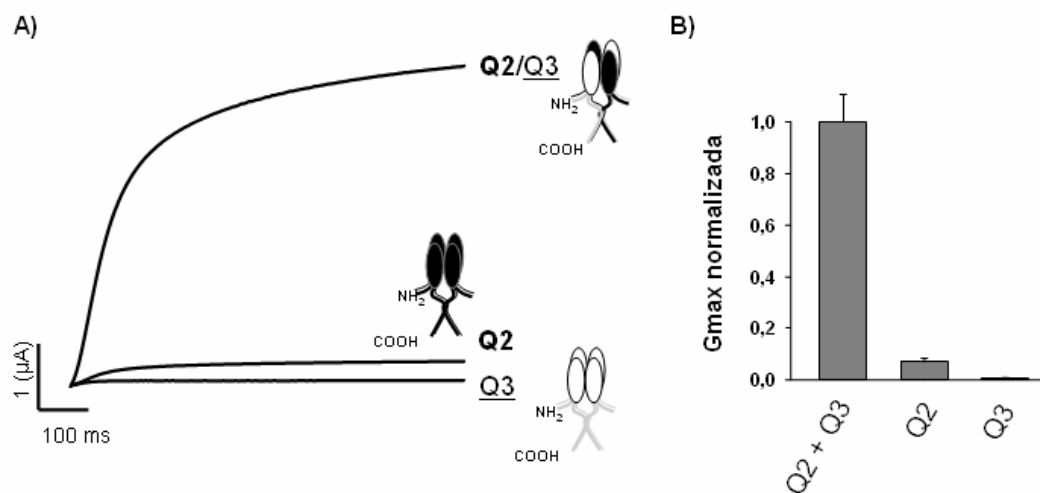


Figura 1. **A)** La coexpresión de subunidades **Q2** y **Q3** produce un gran aumento en corriente. Ovocitos de *Xenopus* fueron inyectados con 10 µg de RNAm total de subunidades **Q3**, **Q2** y **Q2/Q3** (ratio 1:1). A los tres días de expresión a 19°C, las corrientes se registraron mediante la técnica de fijación de voltaje de dos electrodos, evocadas mediante un pulso de 800 ms a +50 mV desde un potencial de membrana de -50 mV. **B)** Promedios de las conductancias máximas obtenidas ($G_{\max} \pm$ error estándar) para cada grupo normalizadas con respecto al control **Q2/Q3**.

Para identificar la región del canal responsable de esta potenciación, construimos quimeras **Q2/Q3** que coexpresamos con **Q3** en ovocitos de *Xenopus*. Como la subunidad **Q3** por si sola prácticamente no produce corriente, buscamos la región de **Q2** que tenía la propiedad de aumentar la corriente.

La topología del canal KCNQ (**Kv7**) es similar a la de otros canales **Kv**. Contiene dos regiones intracelulares **N** y **C**-terminales, seis segmentos transmembranales (**S**) y un

lazo entre el S5 y el S6 que forma el poro del canal (P). Cuatro subunidades se ensamblan para formar el canal tetramérico. El canal se dividió conceptualmente en tres regiones principales, N-terminal, transmembranal y C-terminal (Figura 2). Nos referimos a estas regiones como N, T y C seguido del número de la subunidad de la que proviene.



Figura 2. Representación esquemática de las subunidades **Q2** y **Q3**. La figura indica los aminoácidos de los límites de las tres regiones principales en las que se dividió el canal: N-terminal (N), transmembrana (T), y C-terminal (C). La subunidad **Q2** se muestra en negro y la subunidad **Q3** en blanco.

Intercambiando estas regiones se generaron las seis quimeras principales que fueron coexpresadas con **Q3** además de las subunidades salvajes **Q2** y **Q3**. En la Figura 3B se muestran registros representativos de cada grupo y el promedio de las conductancias máximas obtenidas normalizadas respecto al control **Q2/Q3** (Figura 3A).

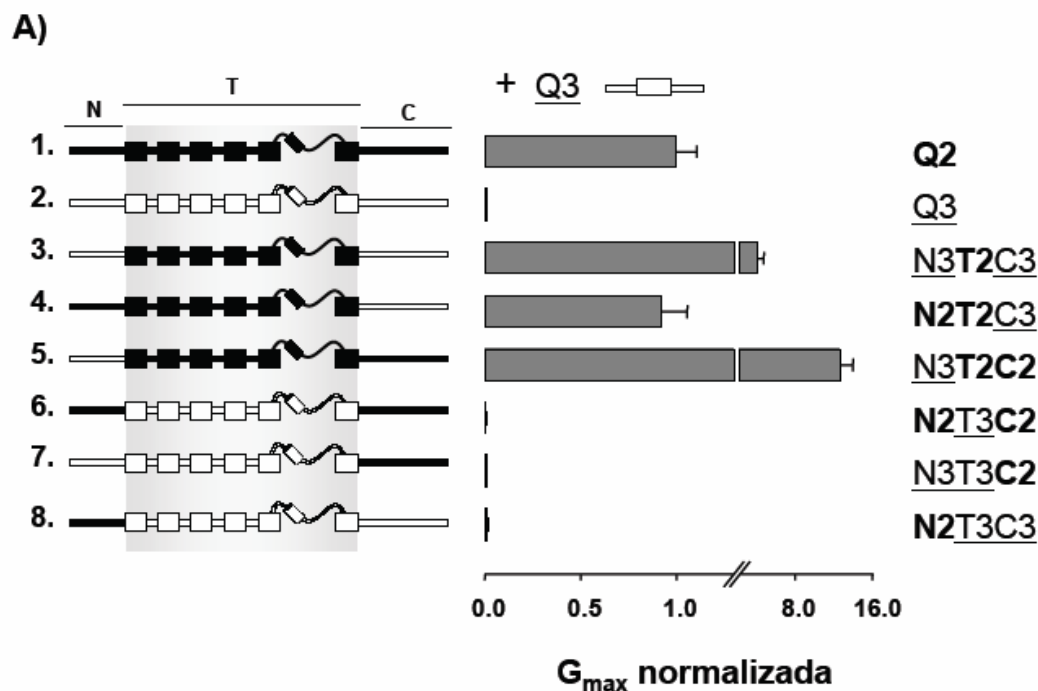


Figura 3. A) A la izquierda del gráfico se representan las subunidades coexpresadas con **Q3** razón 1:1 en ovocitos de *Xenopus*, incluyen las subunidades silvestres y las quimeras construidas intercambiando las tres regiones principales del canal. Se representan los promedios de las conductancias máximas obtenidas ($G_{max} \pm$ error estandar) normalizadas respecto al control **Q2/Q3** ($n \geq 10$ de 2 o más partidas de ovocitos). Aquellas quimeras con la región transmembranal de **Q2** fueron capaces de potenciar la corriente de **Q3**.

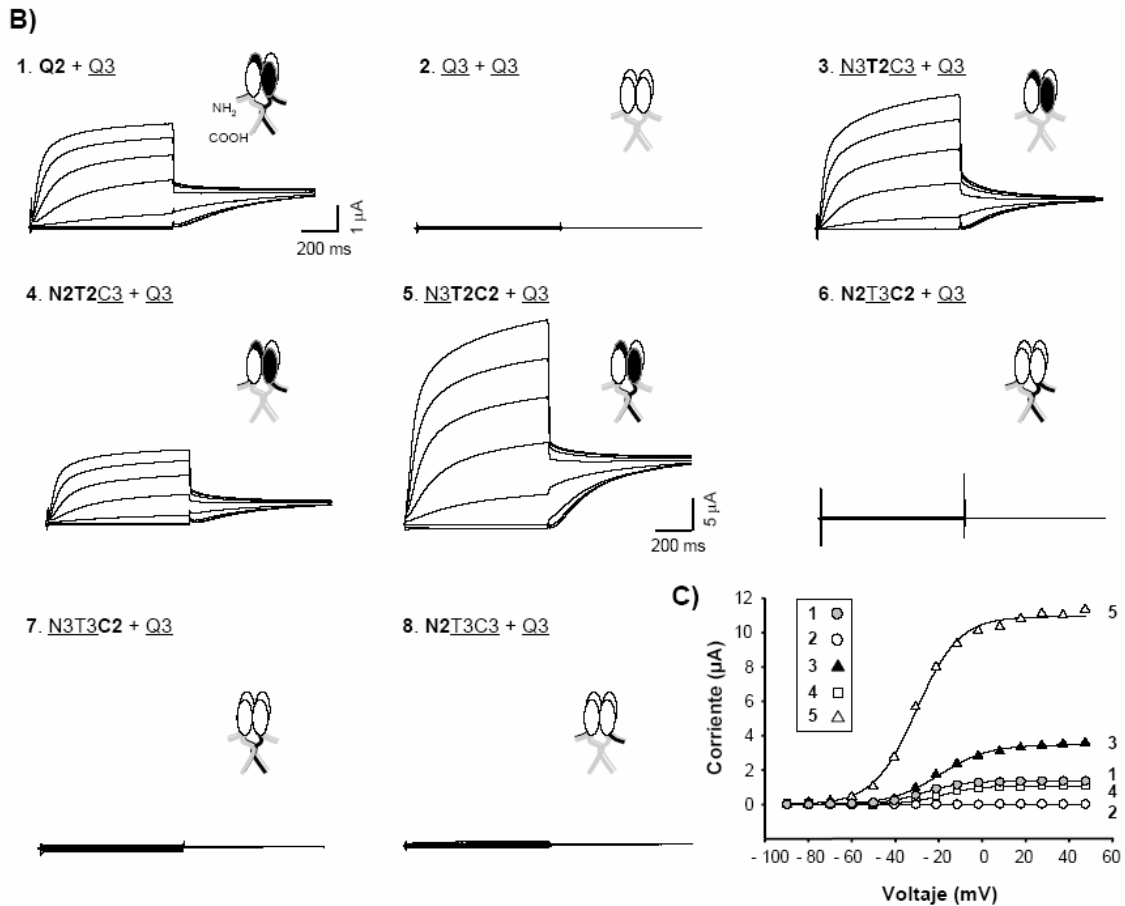


Figura 3. B) Se muestran registros representativos de cada grupo evocados mediante pulsos de voltaje de -120 mV a $+50$ mV en incrementos de 10 mV seguidos de un segundo pulso a -20 mV. La corriente de cola obtenida a -20 mV se representó frente al voltaje del primer pulso (I-V) y se ajustó una ecuación de Boltzmann a los datos. De esta relación se obtuvo la $V_{1/2}$, la pendiente (S) y la corriente máxima (I_{max}) de cada ovocito. **C)** Curvas I-V representativas de cada grupo. Dividiendo la I_{max} por la fuerza electromotriz ($V_m - V_{rev}$) se calculó la G_{max} (Figura 3A). Los valores de $V_{1/2}$ y pendiente (S) promedio para los grupos que expresaron corrientes detectables fueron: **1. Q2/Q3**: $V_{1/2} = -28.7 \pm 0.5$ mV, $S = 10.4 \pm 0.1$ (n = 118); **3. N3T2C3/Q3**: $V_{1/2} = -19.8 \pm 1.5$ mV, $S = 12.6 \pm 0.7$ (n = 9); **4. N2T2C3/Q3**: $V_{1/2} = -22 \pm 1.1$ mV, $S = 11.5 \pm 0.7$ (n = 11); **5. N3T2C2/Q3**: $V_{1/2} = -32.8 \pm 2.3$ mV, $S = 10.3 \pm 0.6$ (n = 11).

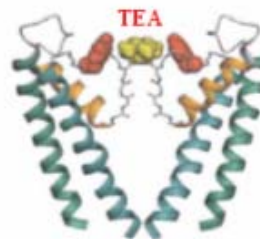
Sólo tres quimeras produjeron corrientes claramente significativas y todas ellas contenían la región transmembranal de **Q2**, **N3T2C3** (3), **N2T2C3** (4), y **N3T2C2** (5). Las quimeras complementarias, **N2T3C2** (6), **7.N3T3C2** (7) y **N2T3C3** (8), que contenían la citada región de Q3 produjeron corrientes apenas detectables, similares a las obtenidas con canales Q3 homoméricos (2).

La expresión heteróloga de las subunidades **Q3** y **Q2** produce canales heteroméricos compuestos por las dos subunidades (Hadley et al., 2003). Para verificar que las subunidades quiméricas no alteraban el ensamblaje y que la corriente registrada provenía

de canales heteroméricos, se utilizó el bloqueante de canales de potasio tetraetilamonio (TEA). Debido a un residuo situado en el poro del canal las dos subunidades muestran diferente sensibilidad a este bloqueante (Wang et al., 1998; Hadley et al., 2000; Figura 4A), de forma que se pueden diferenciar canales homoméricos **Q2** con alta sensibilidad, $IC_{50} \sim 0.2$ mM (0.16 mM: Wang et al., 1998; 0.17 mM: Shapiro et al., 2000; 0.3 mM: Hadley et al., 2003), canales homoméricos **Q3** de muy baja sensibilidad, $IC_{50} > 200$ mM (224mM: Shapiro et al., 2000) y canales heteroméricos de sensibilidad intermedia, $IC_{50} \sim 4$ mM (3.7 mM: Wang et al., 1998; 3.8 mM: Hadley et al., 2000). Las quimeras que produjeron corriente al ser coexpresadas con **Q3** (3, 4 y 5) mostraron sensibilidad intermedia a TEA indistinguible de la obtenida con canales **Q2/Q3** (Figura 4B). Como estas quimeras contenían la región transmembranral de **Q2** dicha sensibilidad indica que los canales expresados son heterómeros formados por dos subunidades **Q3** y dos subunidades quiméricas (Figura 4B). La falta de expresión de las otras tres quimeras (6,7 y 8) no se pudo atribuir a defectos en la biogénesis o ensamblaje, ya que al ser coexpresadas con **Q2** se obtuvieron corrientes (Figura 16B) con sensibilidad intermedia a TEA (datos no mostrados). Por lo tanto, podemos concluir que la región transmembranral de **Q2** es necesaria para aumentar la corriente de **Q3**.

A)

KCNQ2 TYADALWWGLITLTTIGYGDK **Y** PQTWNGR
KCNQ3 TYADALWWGLITLATIGYGDK **T** PKTWEGR



B)

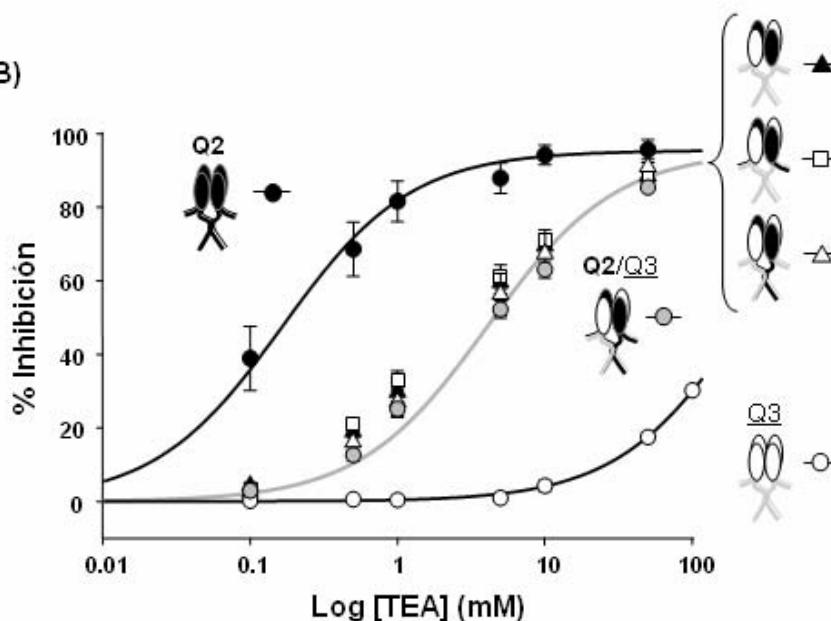


Figura 4. A) Alineamiento de las secuencias del filtro de selectividad (H5) de las subunidades **Q2** y **Q3** indicando el aminoácido que confiere la diferente sensibilidad al bloqueante TEA. A la derecha una imagen del poro de KcsA bloqueado por TEA extracelular (Crouzy et al., 2001). **B)** Curvas dosis-respuesta de la inhibición por TEA de corrientes evocadas de -20 mV a +40 mV. Las líneas son el resultado del ajuste de la ecuación de Hill a los datos cuyos parámetros fueron: $IC_{50} = 0.16 \text{ mM} \pm 0.01$, $h = 0.78 \pm 0.03$ para **Q2** ($n = 7$); $IC_{50} = 4.6 \text{ mM} \pm 0.36$, $h = 0.79 \pm 0.07$ para **Q2/Q3** ($n = 15$) y $IC_{50} = 223 \text{ mM} \pm 9.8$, $h = 1.04 \pm 0.03$ para **Q3** ($n = 4$). Las quimeras que produjeron potenciación con la región transmembrana de **Q2** mostraron sensibilidades a TEA intermedia que se superponían con la de canales **Q2/Q3**: 3. **N3T2C3/Q3** $IC_{50} = 3.17 \pm 1.76$, $h = 0.77 \pm 0.04$ ($n = 4$); 4. **N2T2C3/Q3** $IC_{50} = 2.78 \pm 0.25$, $h = 0.77 \pm 0.04$ ($n = 4$); 5. **N3T2C2/Q3** $IC_{50} = 3.77 \pm 0.26$, $h = 0.81 \pm 0.03$ ($n = 6$).

Un residuo localizado en el poro es crítico para la potenciación de la corriente.

Fuimos reduciendo la zona transmembranal de **Q2** requerida para aumentar la corriente, manteniendo un esqueleto de **Q3**. Los resultados mostraron que la zona crítica se restringía a la zona del poro (Figura 4). La quimera **Q3P2** (12) en la cual la región del poro (P) de la subunidad **Q3** fue intercambiada por la de **Q2** potenció la corriente aún más que la subunidad **Q2** salvaje, mientras que la quimera complementaria **Q2P3** (13) producía corrientes similares a las homoméricas **Q3**. Los canales funcionales una vez más, mostraron sensibilidad intermedia a TEA, indicando la formación de heterómeros. La funcionalidad de las quimeras con la región del poro de **Q3** (13, 14) se verificó coexpresandolas con **Q2** y determinando su naturaleza heteromérico mediante el bloqueo por TEA (datos no mostrados).

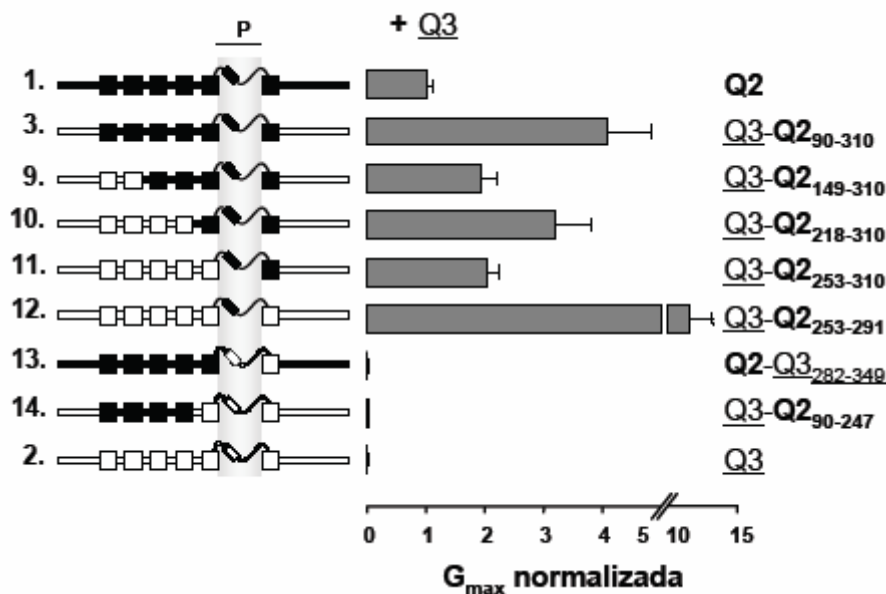
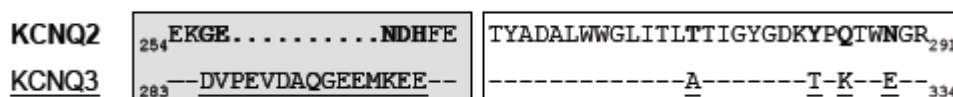


Figura 5. Representación de las quimeras coexpresadas con **Q3** y el promedio de las conductancias máximas ($G_{max} \pm$ error estándar) de cada grupo normalizadas respecto al control **Q2 + Q3** ($n > 10$ de 2

partidas diferentes de ovocitos). A la izquierda se indican los límites de los aminoácidos de **Q2** intercambiados. Las quimeras con la región del poro de Q2 potenciaron la corriente.

El alineamiento de las secuencias de las subunidades **Q2** y **Q3** en la región del poro reveló una región muy poco conservada que correspondía al lazo 5 (recuadro gris) y otra región altamente conservada que forma el filtro de selectividad (H5) y el lazo 6 (recuadro blanco).



Partiendo de la quimera con la menor región de Q2 capaz de aumentar la corriente, **Q3P2** (12), se fueron mutando los residuos que diferían en la región conservada del poro (Figura 5). Cuando la **treonina 276** de **Q2** fue mutada por su equivalente en **Q3**, **alanina 315**, la corriente se redujo a niveles de **Q3** homoméricos (17, 18). Por tanto, podemos concluir que el residuo **T276** es necesario para la potenciación de la corriente.

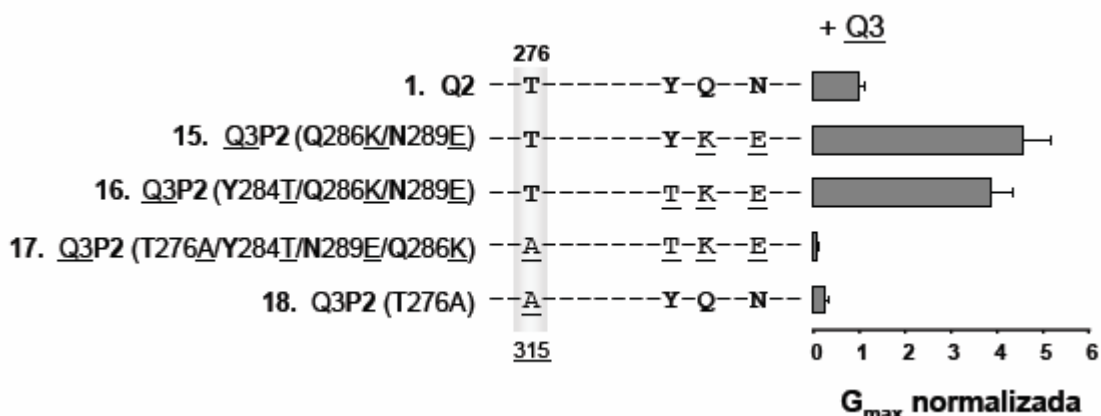


Figura 6. En un esqueleto **Q3P2** (12) se realizaron mutaciones de aminoácidos que diferían en las dos subunidades y se coexpresaron con **Q3**. Se representa la G_{max} promedio normalizada respecto al control **Q2/Q3** ($n > 4$). Cuando la **T276** de **Q2** fue mutada por **A315** de **Q3** la corriente se redujo a niveles de **Q3** homoméricos.

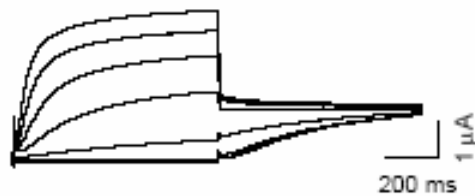
Para investigar si además de necesario este único residuo del poro era suficiente para aumentar la corriente, se construyó el mutante puntual **Q3_{A315T}** y se coexpresó con **Q3** (Figura 7A). El cambio en este único residuo confirió a **Q3** las propiedades de **Q2** de aumentar la corriente de la subunidad **Q3** salvaje. La sustitución del aminoácido equivalente en **Q2_{T276A}** produjo el efecto inverso, al ser coexpresado con **Q3** se inhibió la

capacidad de aumentar la corriente de **Q2**. Las corrientes obtenidas fueron cuantificadas y las subunidades mutantes fueron coexpresadas con diferentes parejas (Figura 7B). La mutación **T276A** evidencia que este residuo es necesario para potenciar la corriente, sin embargo, al contrario que la subunidad **Q3** actúa como un dominante negativo al ser coexpresada con **Q3_{A315T}**. Por lo tanto, la alanina no ejerce el mismo efecto en un contexto **Q2** que en el de **Q3**.

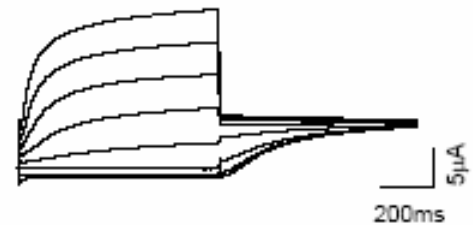
La subunidad **Q3_{A315T}** expresa por si misma, señalando que la **A315** es la responsable de los bajos niveles de corriente observados en canales homoméricos **Q3**. Los niveles de corriente obtenidos con canales homoméricos **Q3** que contenían la mutación **A315T**, en dos de sus subunidades o en las cuatro, fueron tres veces superiores a los obtenidas con **Q2/Q3**. Este efecto no parece ser debido a la sustitución de este residuo. De hecho, la coexpresión de **Q3_{A315T}** con **Q2** produce niveles de corriente similares a los canales heteroméricos salvajes. Este efecto puede adjudicarse al aumento de corriente ejercido por la región N y C terminales de **Q3** como veremos más adelante.

A)

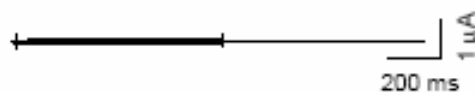
Q2 + Q3



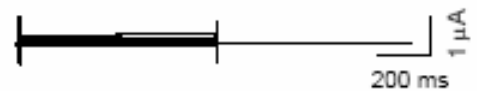
Q3_{A315T} + Q3



2. **Q3 + Q3**



Q2_{T276A} + Q3



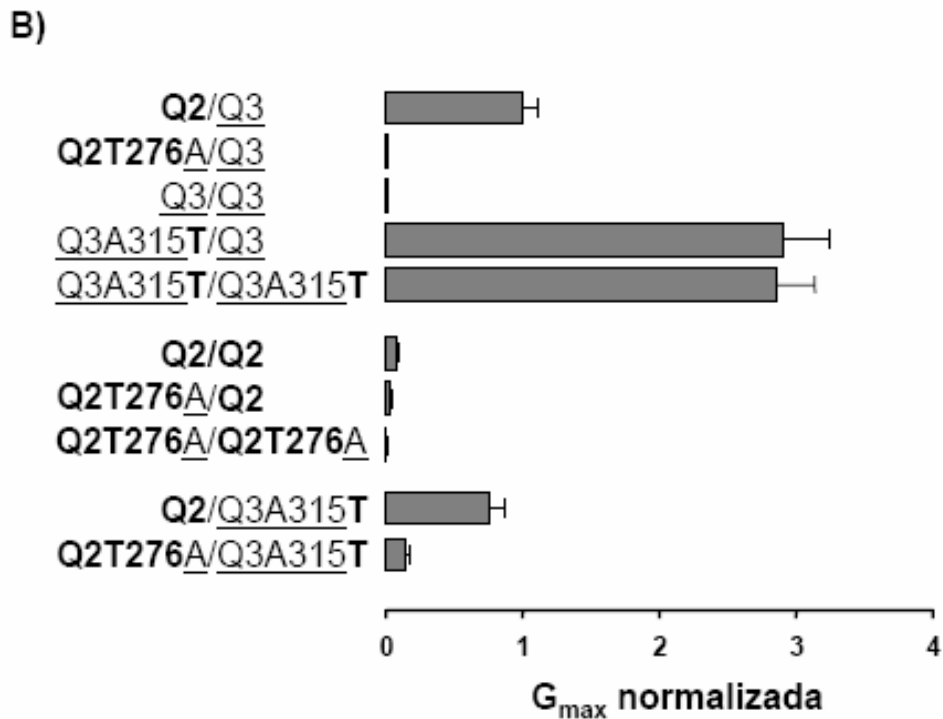


Figura 7. A) Registros representativos de canales mutantes $Q3_{\Delta 315T}/Q3$ y $Q2_{T276\Delta}/Q3$ comparados con las subunidades salvajes (ver protocolo en Figura 3). **B)** Conductancia máxima de los mutantes puntuales del poro coexpresados con diferentes parejas indicadas a la derecha normalizada respecto al control $Q2/Q3$ ($n \geq 8$). El residuo **T276** de **Q2** es necesario para potenciar la corriente y la sustitución de su equivalente en $Q3_{\Delta 315T}$ es suficiente para aumentar los niveles de expresión de canales homoméricos $Q3$.

El residuo del poro A/T controla la inactivación de la corriente.

Los canales homoméricos $Q3$ muestran un descenso en la corriente a voltajes mayores de +20 mV que puede ser debido a un proceso de inactivación que no se observa en los canales **Q2**. El mutante $Q3_{\Delta 315T}$ no inactiva, sin embargo los canales homoméricos $Q2_{T276\Delta}$ muestran inactivación. Estos datos implican que este residuo juega un papel importante en el proceso de compuerta (*gating*) asociado con la inactivación del canal. La subunidad KCNQ1 también muestra inactivación y un residuo crítico en el proceso se localiza en la posición anterior al sitio **T/Δ** (Seebohm et al., 2001b).

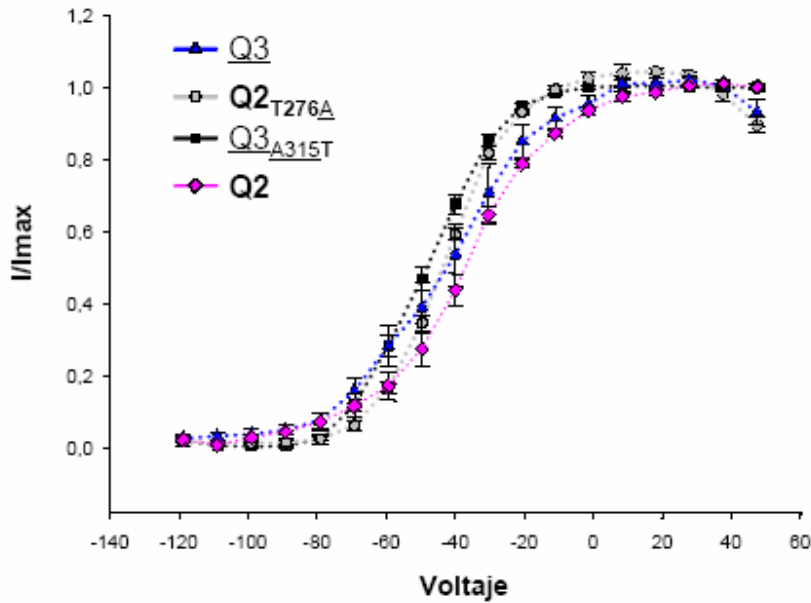


Figura 8. Curvas I-V normalizadas de canales homoméricos $Q3_{A315T}$ y $Q2_{T276A}$ comparados con los canales salvajes. La corriente fue evocada con pulsos de voltaje de -120 mV a +50 mV seguidos de un pulso a -20 mV. Las corrientes de cola a -20 mV fueron normalizadas con respecto a la I_{max} (I/I_{max}) obtenida del ajuste de Boltzmann de la corriente a -20 mV frente al voltaje del pulso precedente. Los valores de $V_{1/2}$ y pendiente (S) promedio fueron; $Q3$: $V_{1/2} = -42.9 \pm 3.8$ mV, $S = 13 \pm 1.16$ ($n = 7$); $Q3_{A315T}$: $V_{1/2} = -40.1 \pm 1.4$; $S = 10.5 \pm 0.22$ ($n = 6$); $Q2$: $V_{1/2} = -32.9 \pm 1.66$, $S = 11.5 \pm 1.08$ ($n = 7$); $Q2_{T276A}$: $V_{1/2} = -44.6 \pm 1.65$, $S = 8.88 \pm 0.57$ ($n = 5$). Los valores de sensibilidad a TEA fueron; $Q2_{T276A}$: $IC_{50} = 0.24$ mM; $Q3_{A315T}$: $IC_{50} > 200$ mM. El residuo A315 confiere la propiedad de inactivación a Q3.

¿De que factores depende la corriente macroscópica?

La corriente macroscópica es el resultado del producto de tres factores: el número de canales en la membrana (N), la probabilidad de que se abra el canal (probabilidad de apertura, p) y una vez abierto el flujo de iones a través de él (conductancia unitaria, i).

$$I = N * p * i$$

El número de canales depende del balance entre la biosíntesis y la degradación además del proceso de transporte de los canales a la membrana celular. La probabilidad de apertura y la conductancia constituyen propiedades biofísicas intrínsecas a cada canal. Trabajos previos habían sugerido que el mecanismo responsable de la potenciación de la corriente tras la coexpresión de las subunidades Q2 y Q3 era el aumento de canales en la membrana (Schwake et al., 2000). Los resultados obtenidos que involucraban a la región transmembrana, y más concretamente al residuo del poro T/A, como responsable de la potenciación fueron inesperados. Por lo tanto, examinamos la expresión en superficie de las quimeras cuya corriente habíamos analizado.

La expresión en superficie se monitorizó etiquetando la subunidad Q3.

Para poder detectar específicamente los canales insertados en la membrana y no aquellos que se encontraban en el interior celular, necesitábamos marcar el canal con un epítopo extracelular. La introducción de la etiqueta debía afectar lo menos posible a la funcionalidad y a las propiedades biofísicas del canal. Para elegir el sitio de inserción del epítopo el criterio que empleamos fue elegir una zona poco conservada que, en principio, podría admitir mayor variabilidad (lazo 5). Utilizamos la subunidad Q3 como reportero de la expresión en superficie ya que esta subunidad por si sola no produce casi canales en la membrana plasmática, sin embargo su coexpresión con Q2 promueve su inserción en la membrana (Schwake et al., 2000).

Introducimos el epítopo FLAG en el lazo 5 de Q3 (Figura 9). La expresión de la construcción Q3-FLAG coexpresada con Q2 en ovocitos de *Xenopus* produjeron corrientes cuya amplitud se redujo un 50% y la sensibilidad a TEA mostró que la estequiometría del canal se veía alterada con la inserción del epítopo. Por lo tanto, esta construcción fue descartada para realizar los experimentos. Simultáneamente, el grupo de Thomas Jentsch realizó ensayos de expresión en superficie con Q3 etiquetado en el lazo extracelular entre el S1 y el S2 (Schwake et al., 2000). Para aumentar la accesibilidad del anticuerpo al epítopo HA, el lazo se alargó 9 aminoácidos flanqueando la etiqueta con fragmentos del lazo extracelular D1-D2 del canal de cloro CIC-5. Amablemente, el profesor Thomas Jentsch nos cedió esta construcción y en nuestras manos produjo típicas corrientes macroscópicas **Q2/Q3** cuya amplitud, sin embargo, se redujo un 50% respecto a la de los silvestres (figura 8). La sensibilidad a voltaje del canal etiquetado fue similar a la obtenida con el canal salvaje ($V_{1/2} = -27.3$ mV y -28.6 mV respectivamente). Intentamos mejorar los niveles de expresión eliminando los residuos que flanquean al HA y probamos también a insertar el epítopo en la mitad del lazo en lugar de al final del mismo (Figura 8). Estas variables produjeron aún menos corriente que la construcción inicial así que se decidió utilizar el Q3-HA del Prof. Jentsch.

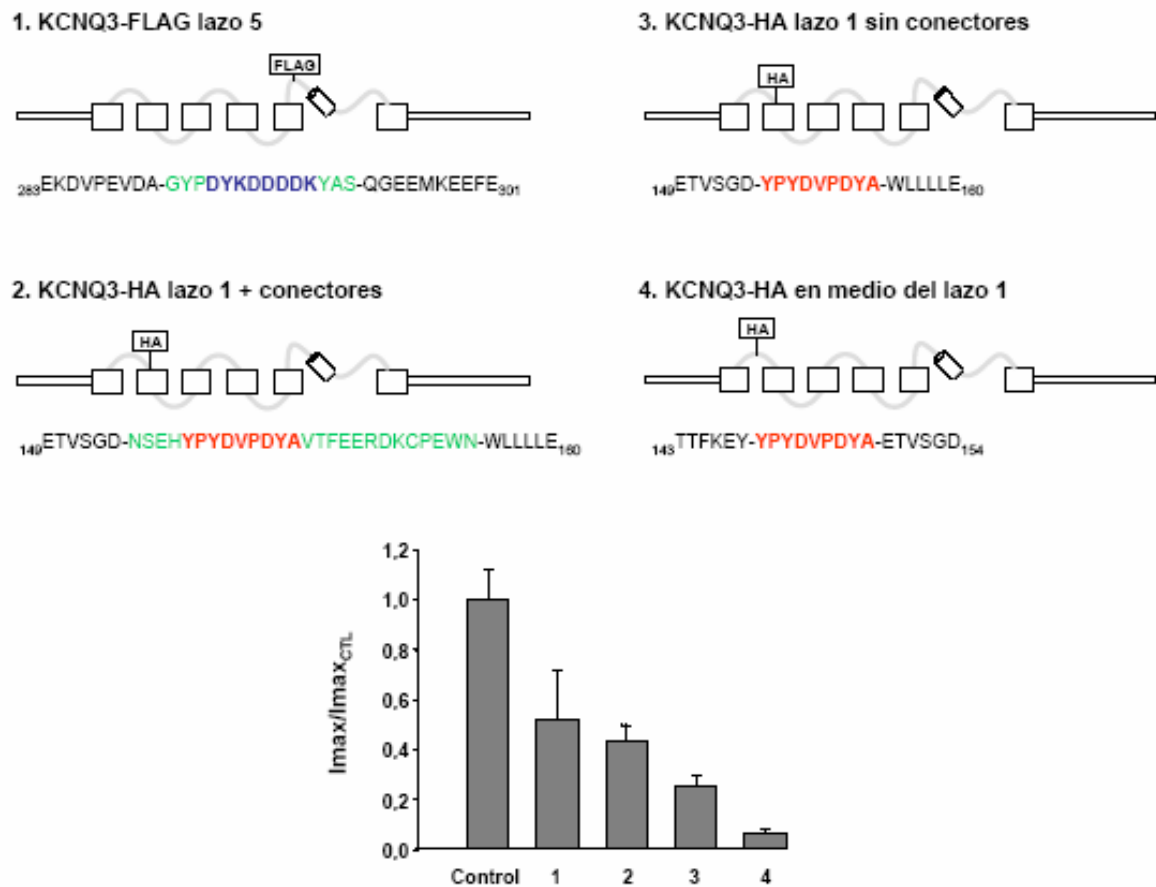


Figura 9. Se muestra la subunidad Q3 etiquetada con el epítipo FLAG y HA en diferentes posiciones y la secuencia detallada de la inserción. Las construcciones etiquetadas fueron coexpresadas con Q2 (ratio 1:1) en ovocitos de *Xenopus* y la corriente máxima (I_{max}) se calculó como se ha descrito anteriormente.

La región C-terminal controla el número de canales en membrana.

Los canales homoméricos Q2 y Q3 se transportan de forma ineficaz a la membrana plasmática, sin embargo la coexpresión produce un aumento en la expresión en superficie de ambas subunidades (Schwake et al., 2000). Los canales quiméricos cuya corriente habíamos registrado anteriormente (Figura 3) fueron coexpresados con la subunidad Q3 marcada con el epítipo HA. La inmunodetección de este epítipo refleja el número de subunidades Q3 en la membrana plasmática (Figura 10).

Sorprendentemente, los niveles de corriente obtenidos anteriormente no se correlacionaron con el número de canales Q3 en membrana. Los experimentos realizados con el bloqueante TEA (Figura 4) demostraron que la naturaleza de los canales quiméricos era heteromérica, es decir, que el canal está constituido por dos subunidades Q3 y dos subunidades quiméricas Q2/Q3. Es por tanto lícito inferir que el número de subunidades Q3 en membrana reflejan el número de canales Q2/Q3 quiméricos. Las quimeras que

contienen la región transmembranal de **Q2** que produjeron potenciación de la corriente (3, 4, 5 y 12) no fueron los que promovieron con mayor eficacia el transporte de las subunidades **Q3** como cabría esperar. Es más, algunas de las que no produjeron corriente muestran niveles de expresión en superficie próximos a los controles **Q2/Q3** (6.N2T3C2 y 7.N3T3C2). Por lo tanto, la región transmembrana de **Q3** no permite expresar niveles de corriente detectables, aunque los canales alcancen la membrana plasmática con eficacia. Esta falta de corriente podría ser debida a un ensamblaje incompleto del tetrámero o a efectos producidos por esta región en las propiedades biofísicas del canal que serán discutidos posteriormente.

Solamente aquellas quimeras con el C-terminal de **Q2** fueron capaces de estimular la expresión en superficie de **Q3**-HA. Cabe destacar que ninguna quimera presentó la misma eficacia que **Q2** en promover la expresión de **Q3**. Estas diferencias sugieren que otras regiones además de la C-terminal podrían estar involucradas en el proceso de tráfico a la membrana plasmática.

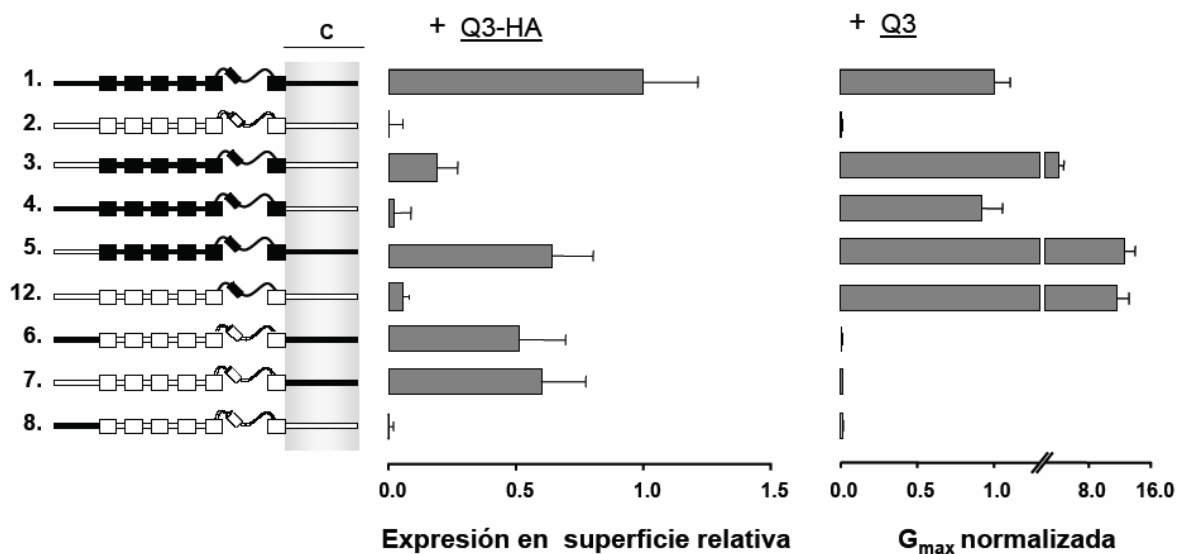


Figura 9. Izquierda, representación esquemática de las quimeras coexpresadas con subunidades **Q3** etiquetadas con HA extracelular en ovocitos de *Xenopus*. Promedios de expresión en superficie relativa (luminiscencia) \pm error estándar normalizados respecto al control **Q2/Q3**-HA. Para facilitar la comparación de los datos de expresión en superficie con los de corriente se reproduce la Figura 2A a la derecha. Los niveles de corriente no se correlacionan con la expresión en superficie. La corriente es controlada por el poro, mientras que el número de canales **Q2/Q3** se regula mediante la región C-terminal.

La región C-terminal contiene cuatro regiones con alta probabilidad de formar hélices- α a las cuales nombramos como hélices A-D. Para acotar la región C-terminal responsable del aumento de expresión en superficie construimos quimeras que dividieran estas hélices y las coexpresamos con la subunidad Q3 etiquetada. Las quimeras C-terminales mantenían la región transmembrana y N-terminal de **Q2**. Los resultados obtenidos sugieren que las hélices **C** y **D** de **Q2** (P553-H641) son necesarias para promover el transporte de Q3 a la membrana.

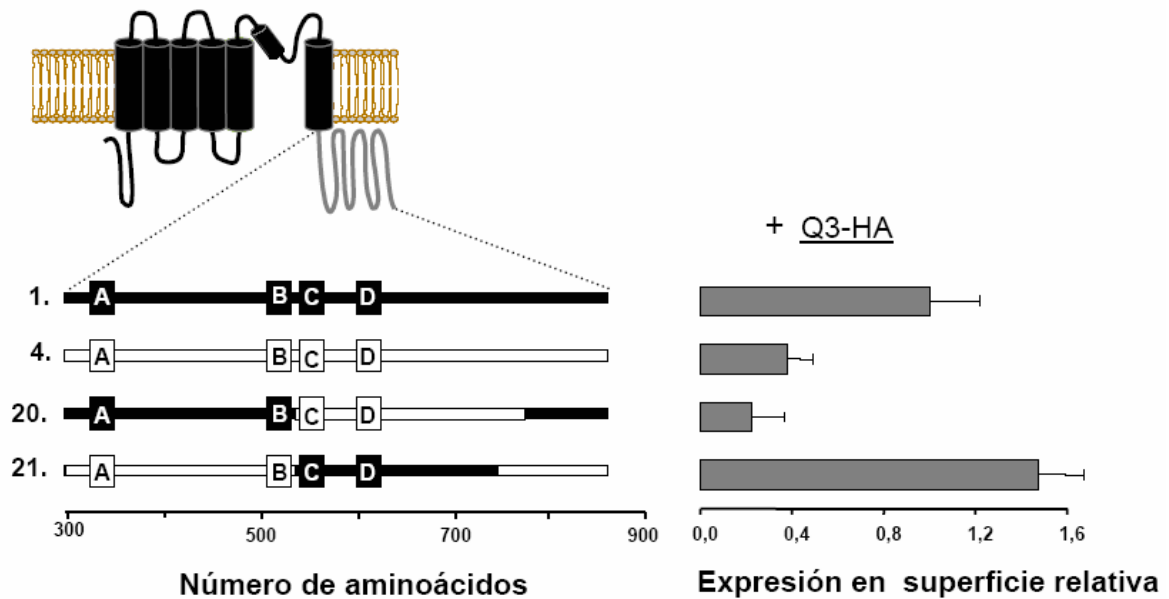


Figura 10. Derecha, representación esquemática de las quimeras coexpresadas con subunidades Q3 etiquetadas con HA extracelular en ovocitos de *Xenopus* (la subunidad **Q2** se muestra en negro y la Q3 en blanco). Promedios de expresión en superficie relativa (luminiscencia) \pm error estandar normalizados respecto al control **Q2/Q3**-HA ($n \geq 8$). Las hélices **C** y **D** de **Q2** que constituyen el dominio de ensamblaje son necesarias para promover la expresión de Q3 en membrana.

Las hélices C y D han sido identificadas como el dominio de ensamblaje en la familia KCNQ (denominado como sid o subunit interacting domain), determinando la especificidad entre subunidades (Schwake et al., 2003). La subunidad Q3 puede ensamblarse con Q2, Q4 y Q5, pero las demás combinaciones no son posibles. El aumento del tráfico de los canales estimulado por las hélices C y D podría deberse a señales de retención/recuperación que son enmascaradas o señales de exportación que son desenmascaradas tras el ensamblaje. Cerca de la hélice C se encuentran agrupaciones de residuos positivamente cargados (KDRTK en Q2, KHKK en Q3) que se asemejan a señales consenso de retención/recuperación (Ma and Jan, 2002).

La expresión en superficie de la subunidad Q3 es controlada por el residuo A315 localizado en el poro.

Hemos visto que mediante la región C-terminal aumenta la expresión en superficie de canales **Q2/Q3** con el consecuente aumento en corriente. Sin embargo, el análisis de quimeras identificó a un residuo del poro como determinante en la potenciación de la corriente. ¿Juega este residuo del poro un papel en el tráfico de los canales o determina su funcionamiento una vez alcanzada la membrana? Evaluamos la expresión en superficie del mutante **Q3_{A315T}** etiquetándolo con HA en el primer lazo extracelular como se ha descrito anteriormente (Figura 12).

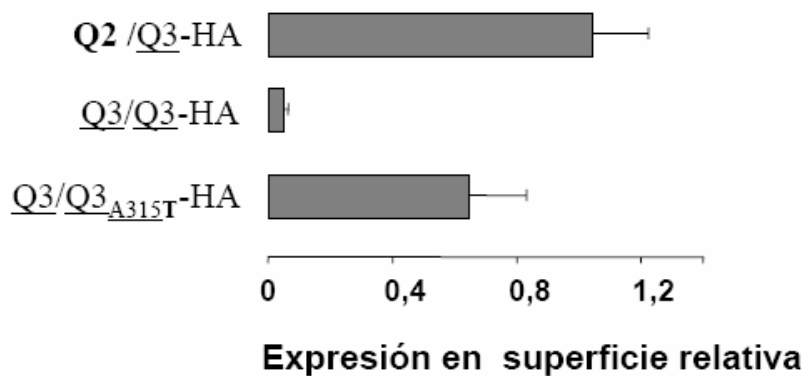


Figura 12. Derecha, se indican las subunidades coexpresadas (20 ng; razón 1:1) etiquetadas con HA extracelular en ovocitos de *Xenopus*. Promedios de expresión en superficie relativa (luminiscencia) \pm error estándar normalizados respecto al control **Q2/Q3-HA**.

Los resultados indicaron que esta mutación puntual aumenta el tráfico de los canales **Q3** a la membrana alcanzando niveles cercanos a canales heteroméricos **Q2+Q3**. Por tanto, el residuo **A315** de **Q3** es responsable de los bajos niveles de expresión de canales homoméricos **Q3**. Sin embargo, canales quiméricos con la región transmembranal de **Q3** (con **A315**) y la región C-terminal heteromérica (6 y 7) fueron capaces de alcanzar la membrana plasmática (Figura 11). Por tanto, además de este residuo del poro existen en la región C-terminal señales que regulan el tráfico de los canales.

El bloqueo diferencial por TEA de las subunidades **Q2** y **Q3** proporciona una herramienta para monitorizar el ensamblaje de los canales expresados. La expresión heteróloga de las subunidades **Q3** y **Q2** produce canales heteroméricos compuestos por las dos subunidades (Hadley et al., 2003). Además, la pendiente de Hill cercana a la unidad indica una única población de canales (ver Shapiro et al., 2000). Nuestros resultados indicaron para la coexpression de **Q2** y **Q3** una IC_{50} de 4.6 mM (3.7 mM: Wang et al.,

1998; 3.8 mM: Hadley et al., 2003) y una pendiente de Hill de 0.78, cercana a la unidad (0.8: Yang et al., 1998; 0.8: Hadley et al., 2000; 0.98: Hadley et al., 2003) que indican también la formación de canales preferentemente heteroméricos (Figura 4). La coexpresión de $Q3_{A315T}$ con $Q2$ desvió la sensibilidad a TEA hacia tipo $Q3$, indicando que la subunidad $Q3_{A315T}$ tenía una contribución mayor en la corriente (Figura 13). El mutante equivalente $Q2_{T276\Delta}$ coexpresado con $Q3$ mostró una sensibilidad a TEA muy cercana a los canales $Q3$ homoméricos, indicando una contribución minoritaria de la subunidad $Q2$ mutante. En ambos mutantes la ecuación de Hill de un solo componente (una única población de canales) no dio un buen ajuste y la reducción de la pendiente de Hill (0.7 y 0.6) sugiere una población mixta de canales con diferentes sensibilidades a TEA. La ecuación de Hill de dos componentes indica la presencia de canales homoméricos de sensibilidad tipo $Q3$ (IC_{50} 250 mM) y canales heteroméricos con sensibilidad intermedia (IC_{50} 7.1 mM). Por lo tanto, el cambio en el residuo del poro alteró la expresión en membrana de canales $Q2/Q3$ facilitando la expresión en superficie de tetrámeros $Q3_{A315T}$ además de heterómeros $Q3_{A315T}/Q2$. El descenso de la cantidad de ARN mensajero del mutante $Q3_{A315T}$ con respecto a la subunidad $Q2$ (razón 1:4 $Q3_{A315T}$, $Q2$) produjo canales heteroméricos (IC_{50} 6.4 mM). La mutación equivalente en $Q2$ dificulta la incorporación de esta subunidad en los canales reduciendo la población de canales heteroméricos $Q2_{T276\Delta}/Q3$ a un 30 %, mientras que el 70% restante eran homoméricas $Q3$.

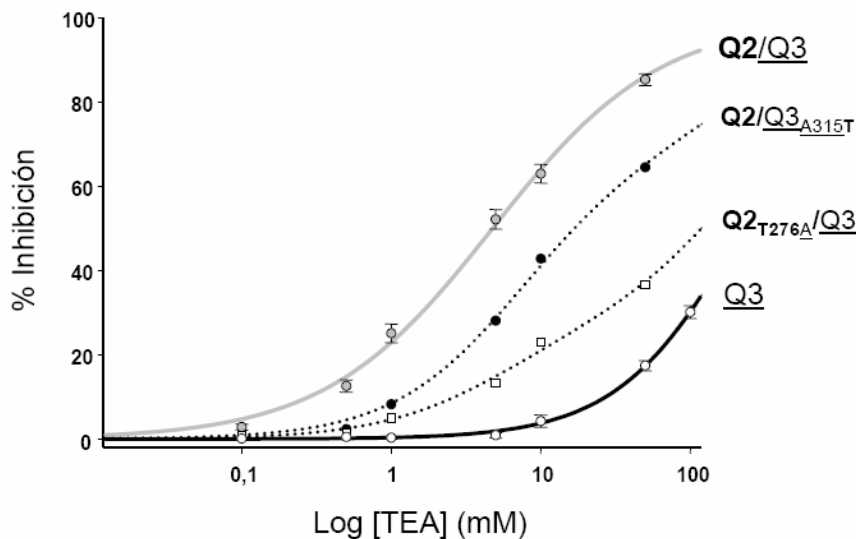


Figura 13. Curvas dosis-respuesta de la inhibición por TEA de corrientes de las subunidades indicadas evocadas de -20 mV a +40 mV. Las líneas continuas son el resultado del ajuste de la ecuación de Hill de un componente a los datos (Figura 4B). Los mutantes puntuales se ajustaron mejor a una ecuación de Hill de dos componentes (líneas discontinuas); $Q3_{A315T}/Q2$ un 68% de la corriente tiene una IC_{50} de 7.1 mM y el 32% restante de 250 mM; $Q2_{T276\Delta}/Q3$ 71% 250 mM y 29% 5.4 mM.

En conclusión, podemos decir que el residuo del poro **T/A** constituye un componente estructural que determina la estequiometría preferente **2Q2:2Q3** de los canales. Proponemos que la subunidad Q3 no puede formar tetrámeros de forma eficaz debido a la **A315** y este efecto es neutralizado al heteromerizar con Q2 que contiene la **T276**.

El lazo extracelular 5 de Q3 podría contener una señal de exportación y/o reciclaje.

Hemos visto como la mutación puntual **Q3_{A315T}** promueve la expresión en la membrana plasmática y expresar corrientes por si mismo incluso en presencia de Q2. ¿Es la mutación puntual suficiente para producir estos efectos? Las quimeras con la región transmembranal de **Q2** (3) o el poro de **Q2** (12) contienen el residuo **T** en el poro, sin embargo, no producen efectos llamativos en la expresión en superficie (Figura 14) y su coexpresión con Q3 produjo corrientes heteroméricas. La comparación de estas construcciones con el mutante **Q3_{A315T}** nos llevó a pensar que el lazo extracelular 5 podría jugar un papel en el proceso de transporte a la membrana. El análisis de la secuencia de este lazo (Figura 14A) revela una hipotética señal de exportación en **Q3** constituida por motivos diacídicos (ExD, ExE) más residuos hidrofóbicos contiguos (V,P,F) y/o agrupaciones de residuos ácidos que promueven el reciclaje de los canales internalizados (EEMKEEFE). Añadimos a la quimera con la zona del poro de **Q2** (12.**Q3P2**) los residuos del lazo de **Q3** (**Q3P2L3**), la coexpresamos con **Q3** y medimos su sensibilidad a TEA. Los resultados mostraron la existencia de dos poblaciones de canales, heteroméricos ($IC_{50} = 4.2$ mM) y homoméricos **Q3P2L3** ($IC_{50} = 0.1$ mM). Es decir la adición de esta secuencia proporciona a la quimera **Q3P2** la habilidad de alcanzar la membrana por si misma.

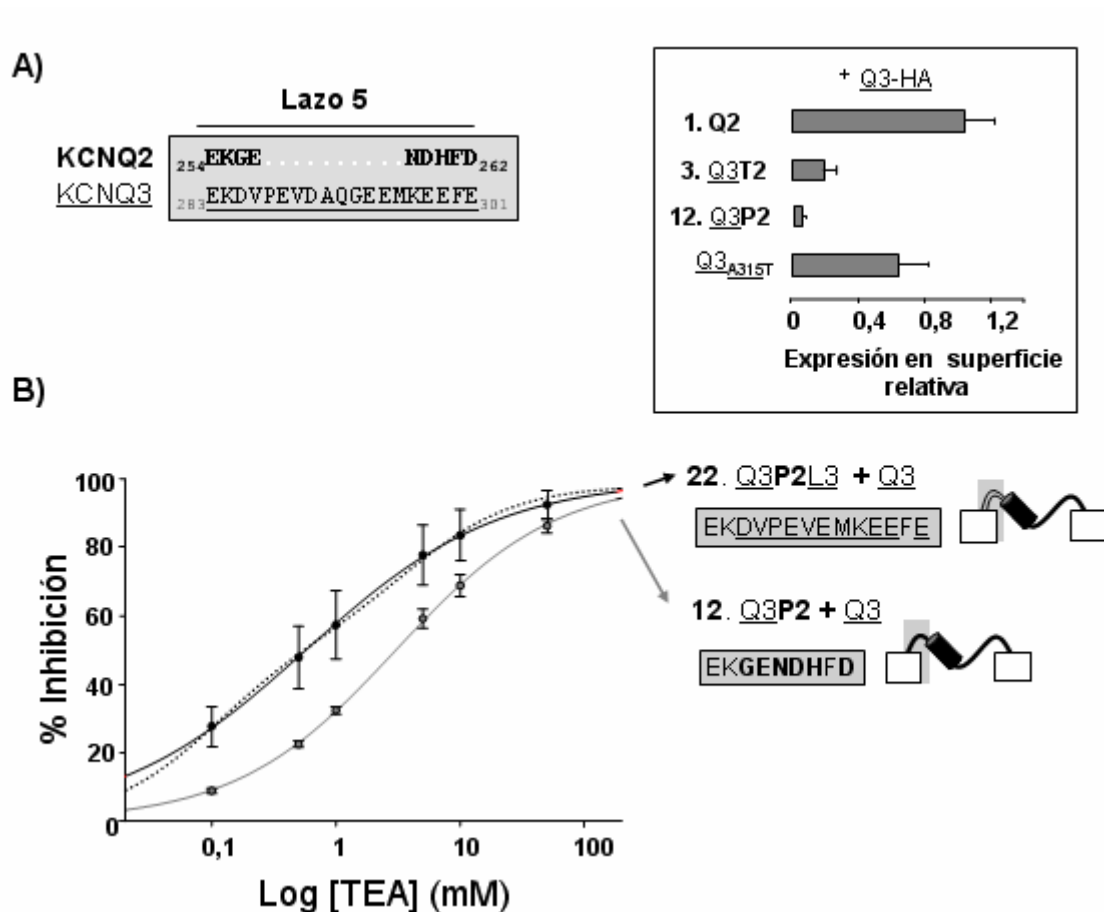


Figura 14. A) Alineamiento de la secuencia del lazo 5 extracelular de las subunidades Q2 y Q3. **B)** Porcentaje de inhibición de las corrientes evocadas de -40 mV a +20 mV de la coexpresión de Q3 con Q3P2 y con Q3P2L3. El ajuste de la ecuación de Hill de un componente a los datos proporcionó los siguientes valores: Q3P2/Q3 $IC_{50} = 3.02 \pm 0.78$, $h = 0.67 \pm 0.01$ ($n = 3$) y Q3P2L3/Q3 $IC_{50} = 0.57 \pm 0.01$, $h = 0.56 \pm 0.01$ ($n = 3$). El ajuste de dos componentes de la ecuación de Hill (línea discontinua); Q3P2L3/Q3 el 54% de la corriente tiene una IC_{50} de 0.1 mM y el 46% restante de 4.2 mM. Recuadro superior derecho, expresión en superficie relativa de las construcciones indicadas (datos de las figuras 10 y 12). La quimera Q3P2 es capaz de alcanzar la membrana por sí misma mediante la inserción del lazo 5 de Q3.

El residuo Q3_{A315} podría formar parte del sitio de unión de un bloqueante interno.

La hipótesis planteada ha sido que la configuración de cuatro alaninas en la posición 315 del poro de Q3 no permite el tráfico de los canales a la membrana plasmática. Sin embargo, el análisis de los resultados de expresión en superficie de las quimeras que dividen el canal en sus tres regiones principales N, T y C (Figura 10), revela que canales con la región transmembranal de Q3 alcanzan la membrana con una eficacia del 50% en comparación con canales Q2/Q3. Una explicación posible sería que estas quimeras

llegaran a la membrana en forma de dímeros en lugar de tetrámeros. Esto explicaría también los bajos niveles de corriente registrados con estas construcciones. Si por el contrario forman tetrámeros ¿por qué no se obtienen niveles de corriente detectables?. La región del vestíbulo interno del poro en otros canales forma parte del sitio de unión a distintas drogas y bloqueantes (Yellen et al., 1991; Mitcheson et al., 2000). La falta de corriente podría atribuirse a que cuatro A315 forman el sitio de unión de un bloqueante interno que impediría el paso de iones K^+ .

Para poner a prueba esta hipótesis se llevaron a cabo registros en macroparches. En esta modalidad, la pipeta de registro contacta con la membrana de forma que se puede registrar la actividad de los canales en el área de la membrana que queda en la boca de la pipeta (configuración de célula adherida). Una vez formado el sello entre la membrana y la pipeta, ésta se puede retirar hasta que se rompe el trozo de membrana que estamos registrando y la cara interna de la membrana queda expuesta a la solución de registro (parche escindido). De esta manera si existe un bloqueante interno al escindir el parche lograríamos que se lavara.

Se expresaron canales Q2/Q3 salvajes en ovocitos de *Xenopus* y se registró la corriente de varios canales en la configuración de célula adherida (Figura 15). La corriente de los canales heteroméricos fue cercana a los 500 pA y al escindir el parche observamos una reducción en la corriente o “desvanecimiento” como se ha descrito anteriormente. La coexpresión de la quimera N3T3C2 (7) con Q3 produce altos niveles de expresión en superficie y sin embargo no se registran corrientes detectables. Cuando llevamos a cabo parches de ovocitos expresando canales N3T3C2/Q3 la corriente registrada fue unas diez veces más pequeña que la del control (~ 40 pA). Sin embargo, al escindir el parche la corriente aumentó entre 2 y 4 veces. Esto ocurrió en 4 de los 5 parches registrados, mientras que en uno la corriente no varió. Estos resultados son preliminares y faltaría determinar que la corriente registrada es en realidad KCNQ utilizando un inhibidor específico. Por lo tanto, los datos presentados sólo nos permiten concluir que la hipótesis del bloqueante interno podría estar bien encaminada.

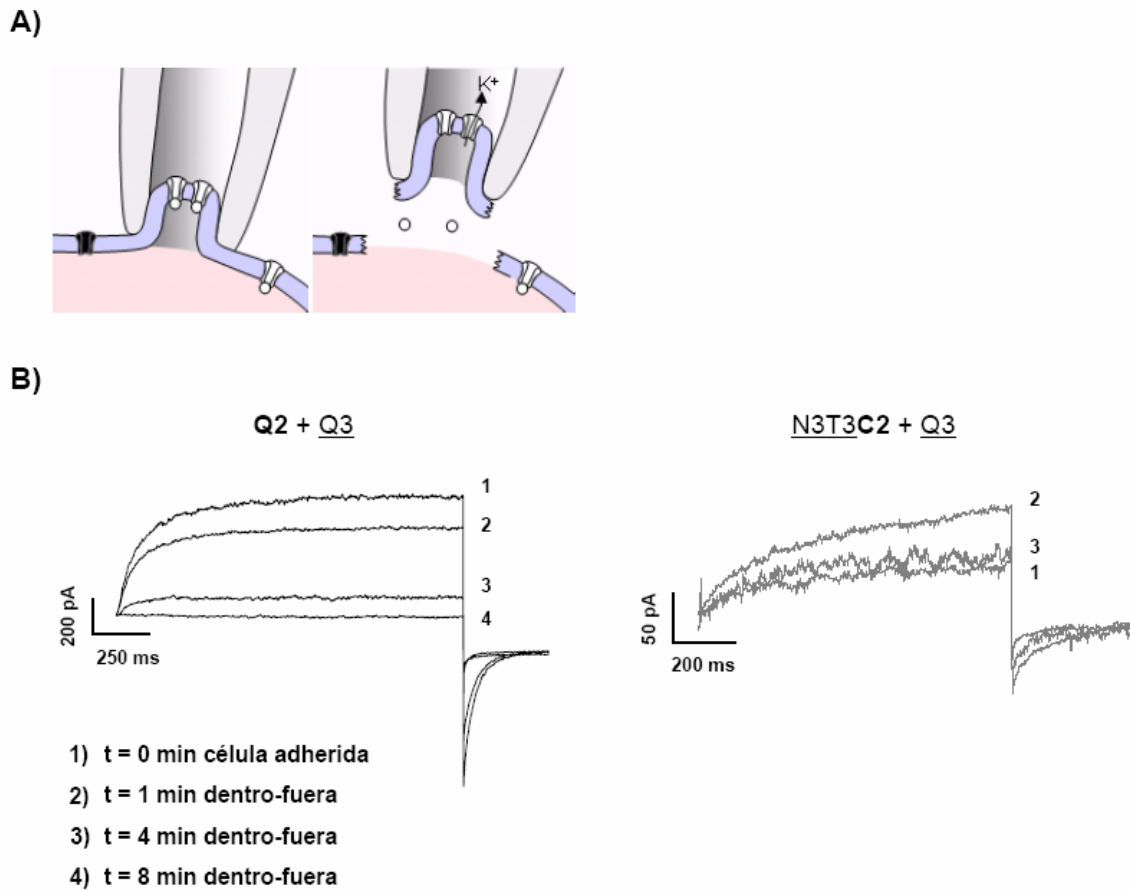


Figura 15. A) Dibujo ilustrativo de la configuración de célula adherida y parche escindido “dentro-fuera”. La bola representa el hipotético bloqueante interno. **B)** Trazas representativas del registro en parches de ovocitos de *Xenopus* en célula adherida y parche escindido a diferentes tiempos de canales **Q2/Q3** y **N3T3C2/Q3**.

La región N-terminal controla la amplitud de la corriente.

Los datos de las quimeras funcionales de la Figura 2 sugerían que el N-terminal jugaba un papel importante en el control de la amplitud de la corriente. Estos datos se vuelven a graficar en la Figura 13A ordenados para mostrar el efecto del N-terminal. Las subunidades con el N-terminal de **Q2** muestran menor conductancia que aquellas con el N-terminal de **Q3**. Comprobamos si este efecto se mantenía al coexpresar estas quimeras con **Q2** (Figura 13B) y se observó que en todas las combinaciones, independientemente de la configuración del resto del canal la conductancia se reducía claramente cuando el N-terminal de **Q3** era reemplazado por el de **Q2**.

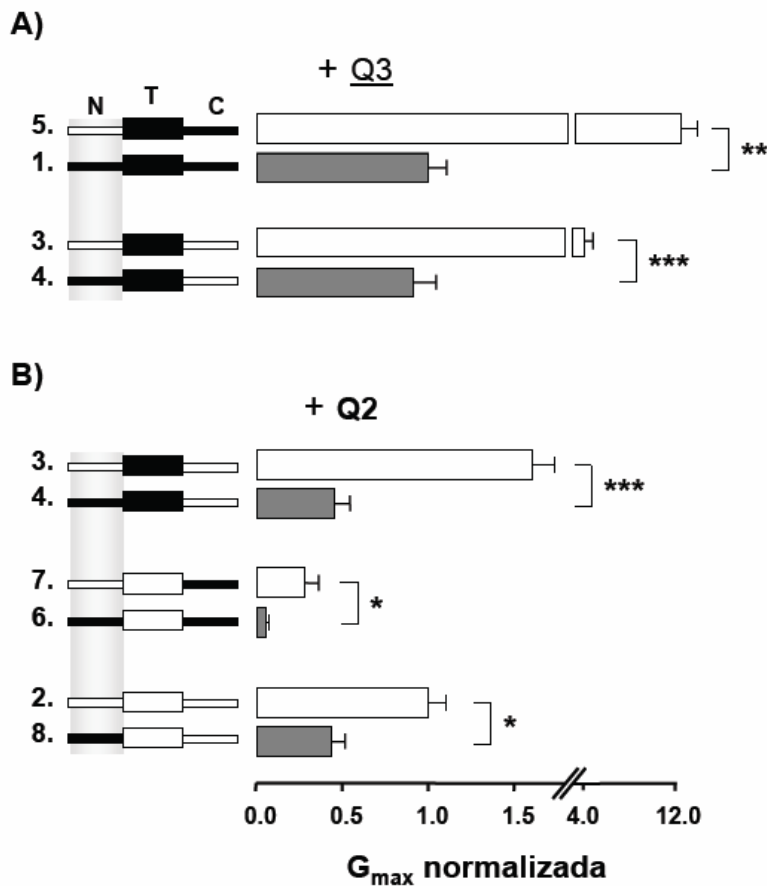


Figura 16. A) Conductancia máxima normalizada de las quimeras indicadas en la derecha, que difieren en la región N-terminal, coexpresadas con Q3 (datos de la Figura 1B). **B)** Conductancia máxima normalizada de quimeras indicadas a la derecha coexpresadas con Q2 ($n > 8$ ovocitos). Las diferencias estadísticamente significativas se indican con asteriscos: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Los valores de $V_{1/2}$ y pendiente (S) promedio para los grupos del apartado B fueron: **3. N3T2C3/Q2**: $V_{1/2} = -18.4 \pm 1.9$ mV, $S = 12.5 \pm 0.5$; **4. N2T2C3/Q2**: $V_{1/2} = -22 \pm 1.1$ mV, $S = 11.5 \pm 0.7$; **7. N3T3C2/Q2**: $V_{1/2} = -41.7 \pm 2.6$ mV, $S = 13.1 \pm 1.3$; **6. N2T3C2/Q2**: $V_{1/2} = -36.8 \pm 2.6$ mV, $S = 11.6 \pm 0.3$; **8. N2T3C3/Q2**: $V_{1/2} = -24 \pm 0.5$ mV, $S = 11.9 \pm 0.7$.

La región N-terminal de Q2 contiene un sitio consenso para la fosforilación por PKA dependiente de AMPc (RxS, donde x es un residuo polar) mientras que la subunidad Q3 no contiene este sitio. Al aumentar los niveles de AMPc intracelular en ovocitos que expresan canales Q2/Q3 la corriente aumenta en un 50% (Schroeder et al., 1998). La introducción de la mutación S52E en la que la carga negativa del glutamato simula un residuo fosforilado aumenta la corriente en un 40%. Para explorar si la propiedad de la región N-terminal de reducir la corriente correlaciona con la existencia de sitios consenso de fosforilación por PKA construimos quimeras con la región N-terminal de otras subunidades de la familia KCNQ, manteniendo la región transmembrana y el C-terminal

de **Q2** (Figura 17). Los resultados mostraron que la región N-terminal de **Q5**, que contiene un sitio consenso de fosforilación por PKA, redujo la corriente de forma similar al dominio N-terminal de **Q2**, mientras que el N4 aumentó la corriente incluso dos veces más que el N-terminal de **Q3**, coincidiendo con la inexistencia de sitios consenso de fosforilación por PKA..

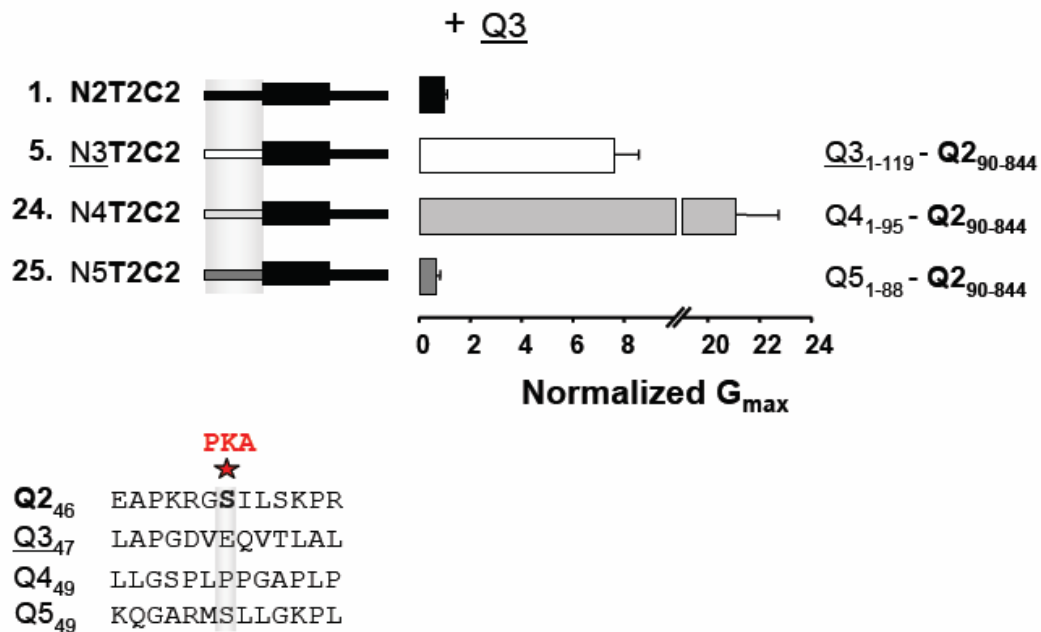


Figura 17. Se representan las quimeras con la región N-terminal de diferentes subunidades KCNQ coexpresadas con **Q3** en ovocitos de *Xenopus* (ratio 1:1). Las corrientes obtenidas se transformaron en conductancia máxima (\pm error estándar) y se normalizó frente al control **Q2/Q3** ($n \geq 6$). Se muestra un alineamiento de la secuencia N-terminal de donde se encuentra la serina fosforilable por PKA en las subunidades **Q2** y **Q5**.

Hemos visto que la región N-terminal no controla el número de canales en membrana (Figura 10) por tanto, el control en la amplitud de la corriente debe ser mediada por cambios en la probabilidad de apertura máxima (p_{max}) o en la conductancia del canal (i). Las medidas realizadas en estos parámetros biofísicos (Li et al., 2004; Li et al., 2005) de canales **Q2**, **Q3** y **Q2/Q3** reflejan niveles de conductancia similares, pero probabilidades de apertura 6 veces mayores en canales homoméricos **Q3** (0.9) respecto a canales **Q2** (0.15). Por lo tanto, la región N-terminal podría modular la amplitud de la corriente controlando la probabilidad de apertura del canal. Recientemente se ha propuesto que el PIP_2 modula la probabilidad de apertura máxima (P_{max}) de los canales **Q2/Q3** sin cambiar

su conductancia (Li et al., 2005), es por tanto posible que la región N-terminal pueda determinar la afinidad del canal por PIP_2 , controlando así la amplitud de la corriente.

Tras la excisión de parches con canales **Q2/Q3** la corriente sufre una fuerte desvanecimiento o *rundown* que refleja, en parte, la pérdida de PIP_2 en el parche (Suh and Hille, 2002) como ocurre en otros canales cuya actividad es modulada por los niveles de PIP_2 en la membrana plasmática (Kir p.j. Kobrinisky et al., 2000). Sin embargo, canales **Q3** homoméricos sufren un desvanecimiento más moderado y la actividad que perdura es mayor (Li et al., 2005). Esta diferencia en el desvanecimiento de la corriente respecto a canales **Q2/Q3** podría ser debida a una mayor afinidad de **Q3** por PIP_2 . Para estudiar si este efecto dependía de la región N-terminal se registró el desvanecimiento de la corriente en macroparches de ovocitos de *Xenopus* (Figura 18) comparando canales **Q2/Q3** con canales con la región N-terminal homomérica **Q3** (**N3T3C2/Q3**). A los 4 minutos de haber escindido el macroparche los canales **Q2/Q3** sufrieron un desvanecimiento del 80%. Canales quiméricos con la región N3 (**N3T3C2/Q3**) mostraron un desvanecimiento más lento, a los 4 minutos se redujo la corriente en un 40%. En parches de **KCNQ1/KCNE1** el desvanecimiento dependiente de PIP_2 se refleja por la aceleración de la desactivación del canal (Loussouarn et al., 2003). Observamos que en el caso de canales **Q2/Q3** el desvanecimiento observado iba también acompañado de un aumento en la velocidad de desactivación de la corriente (τ_{desac}), de 50 ms a 14 ms. La desactivación de los canales quiméricos **N3T3C2/Q3** se mantuvo constante, por lo menos durante el tiempo que se pudo registrar. Estos resultados sugieren el canal formado por la quimera **N3T3C2/Q3** podría tener mayor afinidad por PIP_2 . Se ha propuesto que el PIP_2 podría interactuar con la región C-terminal del canal y que es esta región la que controla la probabilidad de apertura (Zhang et al., 2003; Li et al., 2004). Proponemos que además de la región C-terminal, la región N-terminal también podría modular la afinidad del canal por PIP_2 y que las diferencias en la amplitud de la corriente en las quimeras con el N-terminal de distintas subunidades podría reflejar diferentes afinidades por PIP_2 que modulan la probabilidad de apertura.

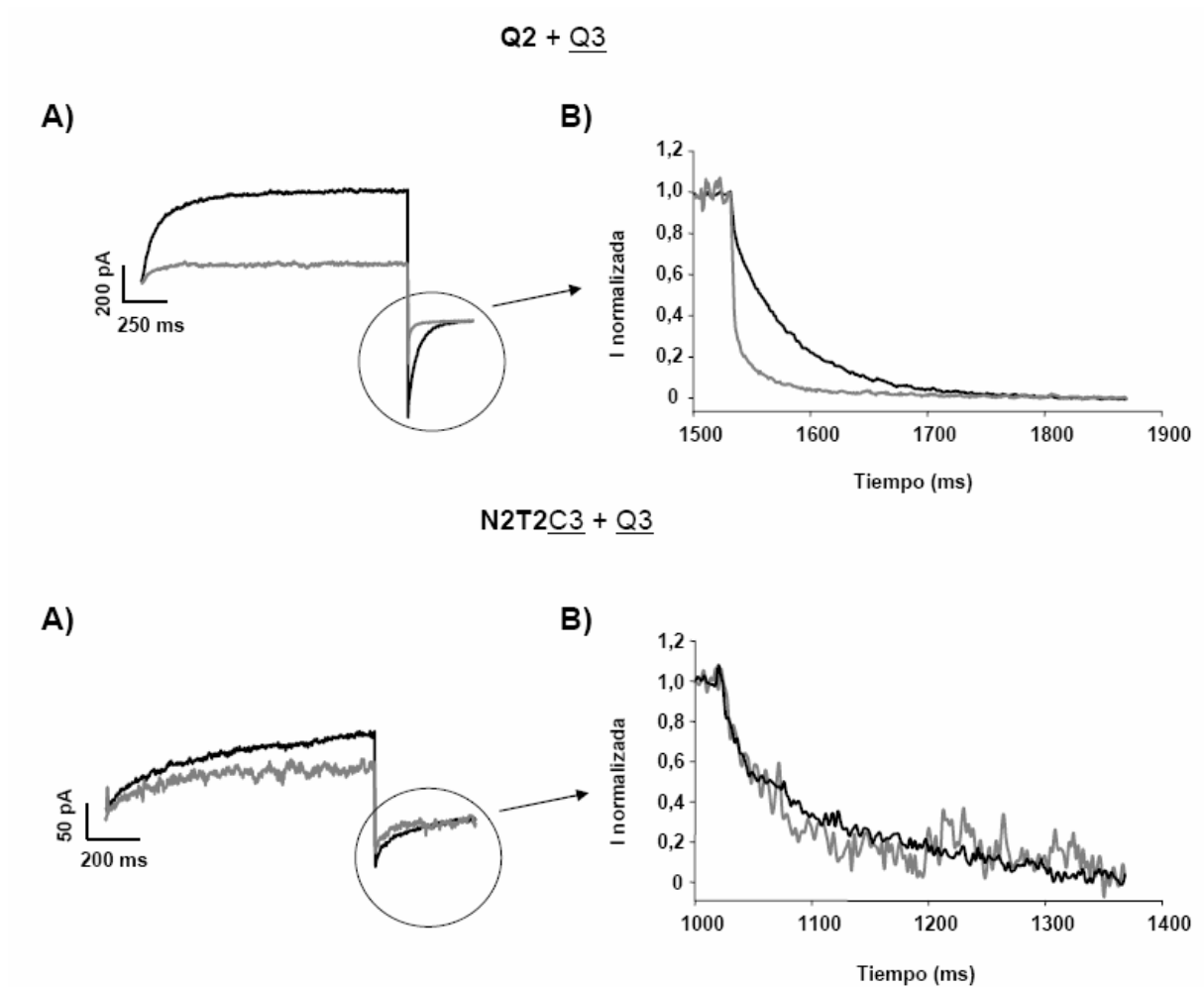


Figura 18. A) Trazas de corrientes de macroparches “dentro-fuera” de ovocitos de *Xenopus* evocadas mediante pulsos de -100 mV a +60 mV y repolarizadas de nuevo a -100 mV tras escindir el parche (línea negra) y 4 minutos después (línea gris). **B)** Para comparar las cinéticas de desactivación las corrientes de cola se normalizaron al principio del pulso de repolarización a -100 mV.

La región C-terminal cambia la sensibilidad a voltaje y los niveles de corriente.

Expresamos diferentes parejas de quimeras para obtener una configuración heteromérica o homomérica (**Q2** o **Q3**) para cada región del canal y evaluar si las tres regiones del canal, N, T y C controlaban la amplitud de la corriente de forma independiente (Figura 19).

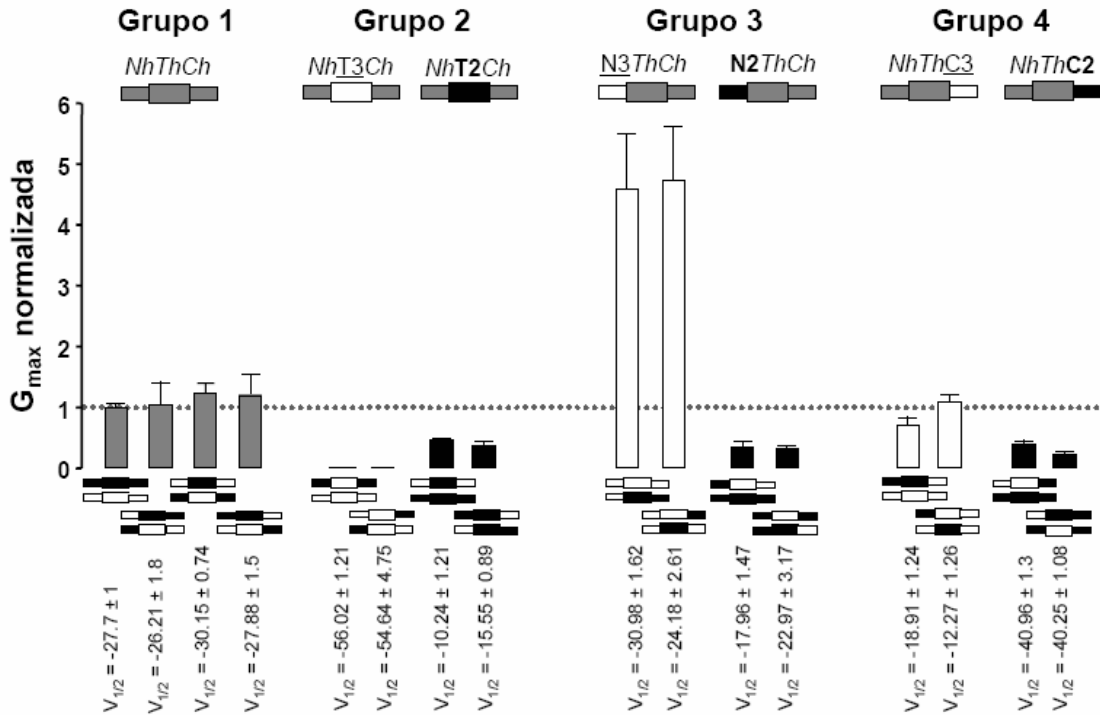


Figura 19. Las parejas de quimeras representadas bajo cada barra fueron coexpresadas creando siete configuraciones que fueron heteroméricas o homoméricas para los segmentos N, T o C. El primer grupo es un canal heteromérico (NhThCh), el segundo tiene la región transmembrana homomérica (NhT3Ch o NhT2Ch), el tercero la región N-terminal (N3ThCh o N2ThCh) y el cuarto el C-terminal (NhThC3 o NhThC2). La configuración de cada región está codificada en colores en la representación esquemática encima de las barras, gris para heteromérica, negra para homomérica Q2 y blanca para homomérica Q3. Las barras representan la conductancia máxima normalizada con respecto al control ($n \geq 6$).

Cada grupo está compuesto por combinaciones de quimeras que dan lugar a la misma configuración en el canal tetramérico. El primer grupo muestra cuatro combinaciones de quimeras que forman canales heteroméricos (NhThCh) como los obtenidos por la coexpresión de **Q2**/**Q3**. Los niveles de corriente fueron similares en los cuatro casos demostrando que la posición de cada región (**Q2** o **Q3**) en la configuración final no parece revelante en términos de amplitud de corriente. En lo que respecta a la región transmembrana (Grupo 2) la configuración homomérica **Q3** (NhT3Ch) no produjo corrientes detectables como ya habíamos visto anteriormente. Los canales con el transmembrana de **Q2** expresaron alrededor de un 60% menos que el control posiblemente por la falta del supuesto motivo de exportación localizado en el lazo extracelular 5 de **Q3**. En el grupo 3 se analizó la región N-terminal y como se ha descrito el N-terminal homomérico **Q3** aumentó la corriente hasta 5 veces mientras que el N-terminal de **Q2** la reduce alrededor de un 60%. Respecto a la región C-terminal (Grupo 4) cabe

esperar una reducción en la corriente en canales con la configuración C-terminal homomérica **Q2** y homomérica Q3 debida al descenso del número de canales en membrana. Este fue el caso para los canales NhTh**C2** pero los niveles de corriente de la configuración C-terminal homomérica Q3 no son estadísticamente diferentes del control **Q2/Q3**. Por lo tanto, además de controlar el transporte de los canales la región C-terminal controla la amplitud de la corriente mediante otros mecanismos. Apoyando esta idea se observó un desplazamiento sistemático en la $V_{1/2}$, dependiente de la configuración de la región C-terminal. Canales con la región C-terminal homomérica **Q2** (*NbThC2*) mostraron un desplazamiento hacia potenciales negativos ($V_{1/2} = -40$ mV) y aquellos con la región C-terminal de Q3 (*NbThC3*) mostraron una $V_{1/2}$ más despolarizada ($V_{1/2} \sim -15$ mV). Esta observación podría atribuirse a la fosforilación basal de la región C-terminal de **Q2** por PKC (Nakajo and Kubo, 2005).

En resumen, las regiones N y C terminal de **Q2** ejercen un freno sobre la corriente mientras que el N y C de Q3 la aumentan. Pensamos que el mismo mecanismo subyace en el control de la corriente de ambas regiones, cambios en la probabilidad de apertura provocados por la diferente afinidad a PIP_2 .

3.2 FISIOPATOLOGÍA DE LA EPILEPSIA EN HUMANOS CAUDASA POR MUTACIONES EN KCNQ2.

Mutaciones que producen BFNC reducen la corriente.

Las convulsiones familiares neonatales benignas (BFNC) es una epilepsia rara (1/100.000) determinada genéticamente (autosómica dominante). Los ataques empiezan alrededor del cuarto día de vida, cesan después de 1-3 meses y los bebés se desarrollan con normalidad. Sin embargo las personas afectadas corren un riesgo de 10-16% de tener epilepsia en la edad adulta (Lerche et al., 2001). Se han descrito alrededor de cuarenta mutaciones en la subunidad Q2 y tres en Q3 que producen BFNC. Se agrupan, sobre todo, en el sensor de voltaje, el poro y la región C-terminal. Más del 50% de las mutaciones identificadas se localizan en la región C-terminal de KCNQ2 (ver anexo 1). El ensamblaje de las subunidades Q2 y Q3 aumenta el número de canales en membrana y los resultados obtenidos indican que la región C-terminal media este proceso. Además, esta región controla los niveles de corriente modificando la probabilidad de apertura del canal (Li et al., 2005). La región C-terminal de Q2 interacciona con diversas proteínas como la CaM, el PIP₂ y la proteína andamio AKAP que podrían estar involucradas en estos procesos (Yus-Nájera et al., 2002; Hoshi et al., 2003; Zhang et al., 2003).

Nos propusimos caracterizar funcionalmente algunas mutaciones puntuales del extremo C-terminal de Q2 localizadas en las hélices A, B y C. Primero, procedimos a evaluar el efecto de las mutaciones en la corriente de canales heteroméricos Q2/Q3 registrada en ovocitos de *Xenopus* (Figura 20). Todas las mutaciones redujeron la corriente alrededor de un 80% excepto el mutante Q2_{K526N} que dio niveles de corriente incluso mayores que las del control (el aumento no es estadísticamente significativo). En cuanto a la sensibilidad a voltaje, las mutaciones Q2_{R333Q}, Q2_{R353G} y Q2_{K526N} no provocaron cambios significativos. El estudio funcional previo de la mutación Q2_{K526N} en células CHO (Borgatti et al., 2004) tampoco mostró cambios en la amplitud en corriente, sin embargo, observaron un descenso en la sensibilidad a voltaje de 10 mV. Los grupos con las subunidades mutantes Q2_{L339R} y Q2_{R553Q} desplazaron la V_{1/2} hacia la izquierda y a la derecha respectivamente. El desplazamiento hacia la izquierda de los canales Q2_{L339R}/Q3 puede deberse a la presencia de canales homoméricos Q3 (o canales 3Q3:1Q2) con V_{1/2} más hiperpolarizada (~ -50 mV) que la observada para canales heteroméricos (~ -30 mV). La observación de una mayor contribución de subunidades Q3 al coexpresar Q2_{L339R} con Q3 se vio sustentada por la sensibilidad a TEA que mostró la corriente (inhibición a 5 mM TEA ~ 30% frente a un ~ 60% de canales heteroméricos).

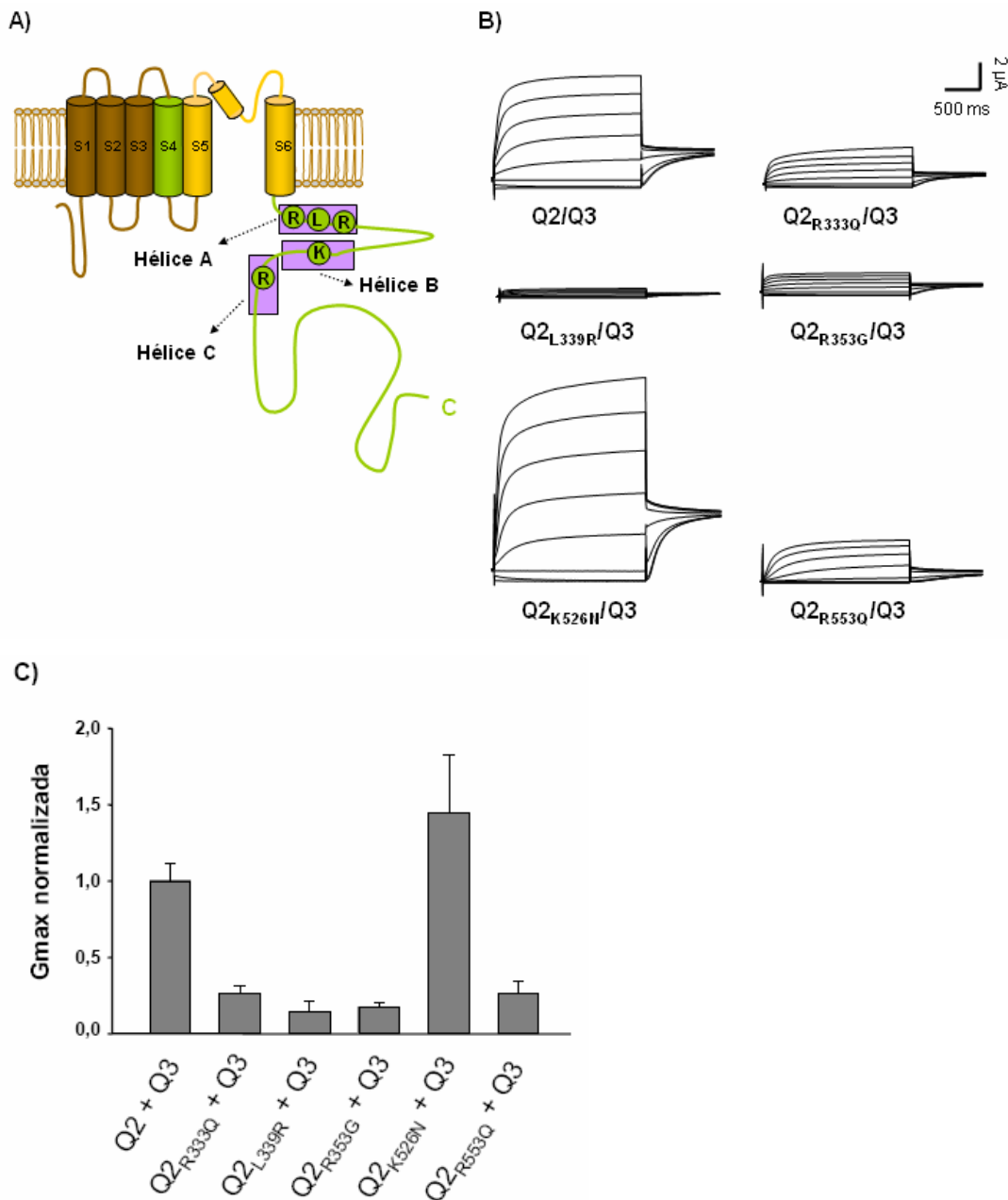


Figura 20. **A)** Esquema de una subunidad Q2 indicando la localización de varias mutaciones puntuales identificadas en pacientes con BFNC; R333Q (Singh et al., 2003); L339R (Moulard et al., 2001); R353G (Richards et al., 2004); K526N (Borgatti et al., 2004); R553Q (Moulard et al., 2001). **B)** Las subunidades Q2 con las mutaciones indicadas fueron coexpresadas con Q3 en ovocitos de *Xenopus*. Se muestran registros representativos evocados mediante pulsos de voltaje de -90 mV a +50 mV en incrementos de 20 mV seguidos de un segundo pulso a -20 mV. **C)** Medias de conductancias máximas normalizadas con respecto al control Q2/Q3 ($n \geq 6$). Los parámetros de Boltzmann obtenidos de la relación corriente voltaje fueron; Q2/Q3: $V_{1/2} = -38.6 \pm 1.5$, $S = 9.6 \pm 0.6$; Q2_{R333Q}/Q3: $V_{1/2} = -32.1 \pm 2$, $S = 8.8 \pm 0.8$; Q2_{L339R}/Q3: $V_{1/2} = -50.6 \pm 2.9$, $S = 7.6 \pm 0.4$; Q2_{R353G}/Q3: $V_{1/2} = -44.4 \pm 2.5$, $S = 8.4 \pm 0.3$; Q2_{K526N}/Q3: $V_{1/2} = -34.4 \pm 3.4$, $S = 10.8 \pm 0.6$; Q2_{R553Q}/Q3: $V_{1/2} = -27.1 \pm 1.8$, $S = 12.6 \pm 1.4$.

Mutaciones asociadas a BFNC reducen la corriente porque su expresión en membrana está alterada.

La reducción en corriente producida por las mutaciones puede ser debida a un descenso del número de canales en la membrana o por disfunciones en las propiedades biofísicas del canal (probabilidad de apertura o conductancia). Para poder distinguir entre estas dos posibilidades utilizamos como reportero la subunidad Q3 etiquetada con un epítipo HA extracelular, que coexpresamos con las diferentes subunidades Q2 mutantes en ovocitos de *Xenopus* (Figura 21). La detección del epítipo HA utilizando un ensayo basado en la luminiscencia produce una señal proporcional al número de canales heteroméricos en la membrana.

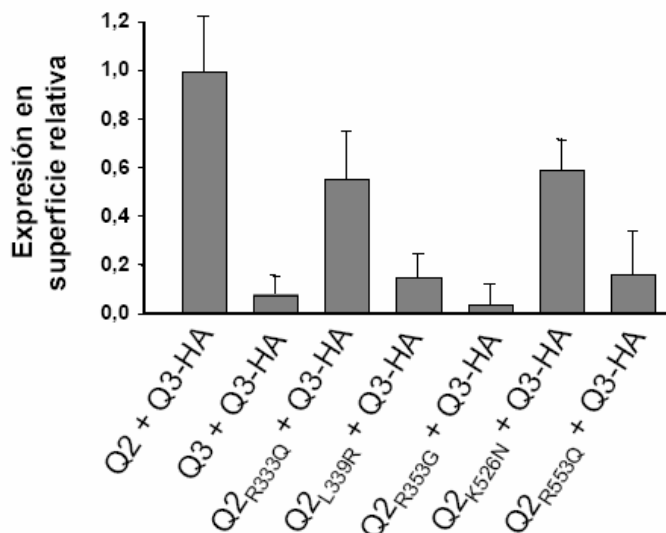


Figura 21. Las mutaciones puntuales C-terminales identificadas en BFNC se coexpresaron con Q3-HA extracelular en ovocitos de *Xenopus*. Las barras muestran los promedios de expresión en superficie relativa (luminiscencia) \pm error estándar normalizados respecto al control **Q2/Q3-HA** ($n \geq 15$). Como control negativo se utilizó el grupo Q3/Q3-HA.

Las mutaciones Q2_{L339R}, Q2_{R353G} y Q2_{R553Q} provocaron una reducción del 80-90% en su capacidad para llevar a la membrana a la subunidad Q3 comparadas con la subunidad Q2 salvaje. Estos resultados indican que la reducción en corriente observada en los canales con estas mutaciones se debe a la disminución del número de canales en membrana. Por el contrario, la reducción en corriente provocada por la mutación R333Q no se pudo explicar con un descenso en la expresión en superficie. La mutación Q2_{K526N} llamativamente, aunque no expresa menos corriente que la subunidad salvaje muestra una reducción de alrededor de un 50% (aunque la diferencia no es estadísticamente significativa).

Las mutaciones en Q2 no afectan al ensamblaje con Q3.

Los canales homoméricos Q2 y Q3 no se expresan por sí mismos de forma eficaz en la membrana, por tanto defectos en el ensamblaje podrían provocar un descenso de la expresión en superficie. Para verificar la capacidad de ensamblaje con Q3 de las diferentes mutaciones de Q2 se hicieron experimentos de ensamblaje basados en la dominancia negativa (Figura 20). Para ello, utilizamos el mutante puntual Q3_{A315T} (Q3*) que produce corrientes de gran amplitud por sí mismo (Figura 7). Cuando la subunidad Q2 salvaje es coexpresada con el mutante Q3* la corriente se reduce a la mitad porque los canales Q2/Q3* expresan menos que los homoméricos Q3*. Esta reducción (o mayor) indica que las dos subunidades se están ensamblando. En caso contrario la corriente no variaría con respecto al grupo de referencia Q3* sólo, ya que la cantidad de ARNm de Q3* se mantiene constante. Coexpresamos los diferentes mutantes asociados a BFNC con Q3* y se obtuvo una reducción mayor del 50% en todos los casos indicando que la reducción de expresión en superficie no es debida a defectos de ensamblaje.

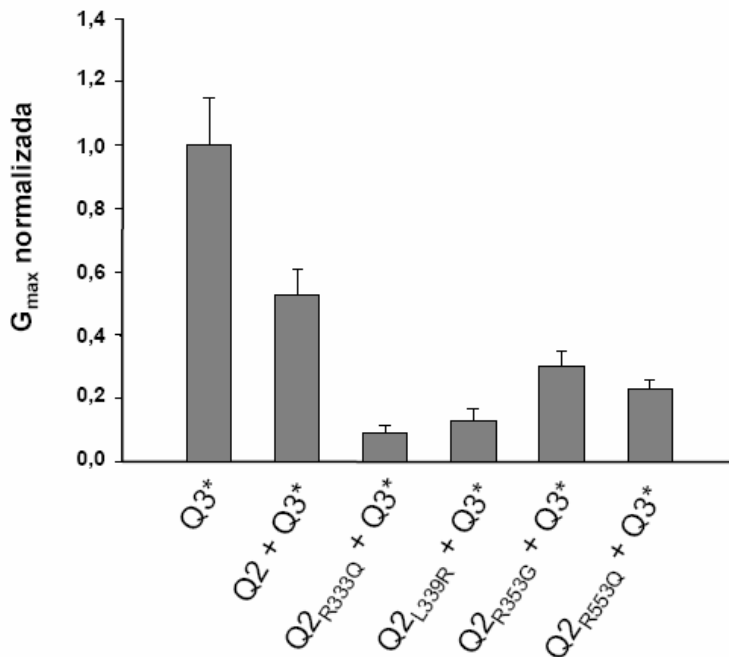


Figura 22. El mutante puntual Q3_{A315T} (Q3*) se expresó por sí mismo como grupo de referencia (razón 1:0) y fue coexpresado con la subunidad salvaje Q2 o con las diferentes mutaciones de Q2 identificadas en casos de BFNC (razón 1:3). Las barras ($n \geq 6$) muestran la conductancia máxima media de cada grupo (\pm error estándar) normalizadas con respecto al grupo de referencia. La reducción del 50% producida por la subunidad Q2 o mayor indican el ensamblaje de las subunidades coexpresadas.

La reducción en expresión en superficie se asocia con alteraciones en la interacción del canal con CaM.

La calmodulina (CaM) se une a la región C-terminal de todos los miembros de la familia KCNQ, a través de dos regiones discontinuas (Yus-Nájera et al., 2002). Las mutaciones Q2_{L339R}, Q2_{R353G} y Q2_{K526N} localizan en los motivos de unión de CaM, los primeros dos en la hélice A que contienen un motivo IQ de unión a CaM y el tercero en la hélice B donde se encuentran dos motivos 1-5-10 (Figura 23).

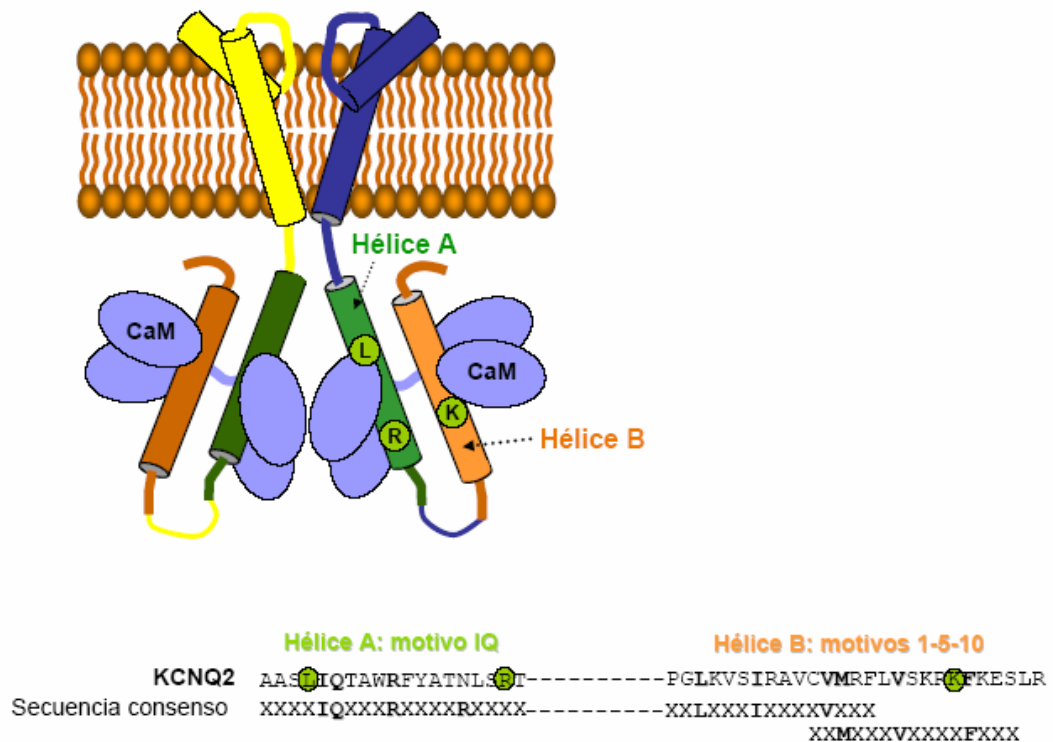


Figura 23. La CaM se une directamente a los canales KCNQ a través de un motivo IQ en la hélice A y dos motivos 1-5-10 en la hélice B (residuos hidrofóbicos clave espaciados). Las mutaciones asociadas a BFNC Q2_{L339R}, Q2_{R353G} y Q2_{K526N} se localizan en estas regiones de unión a CaM.

Un mecanismo común por el cual los dominios citoplasmáticos influyen en el tráfico a la membrana es interaccionando con otras proteínas moduladoras. Por tanto, evaluamos la capacidad de unión a CaM mediante inmunoprecipitaciones de las subunidades Q2 mutantes que redujeron la expresión en superficie y que localizan en el sitio de unión de CaM.

Los canales se etiquetaron en su extremos N-terminal intracelular, con 5 epítomos Myc la subunidad Q2 y con dos epítomos HA la subunidad Q3. La adición de estas etiquetas no afectó a los niveles de expresión del canal ni a sus propiedades biofísicas.

Extractos de células HEK293T transfectadas con la subunidad Q2 salvaje y mutantes fueron inmunoprecipitados mediante Proteína A unida a un anticuerpo anti-myc, arrastrando la CaM unida (Figura 24). Además de las mutaciones puntuales localizadas en los sitios de unión a CaM descritas incluimos la mutación Q2_{I340E} como control negativo que destruye el sitio IQ de unión a calmodulina (Yus-Nájera et al., 2002).

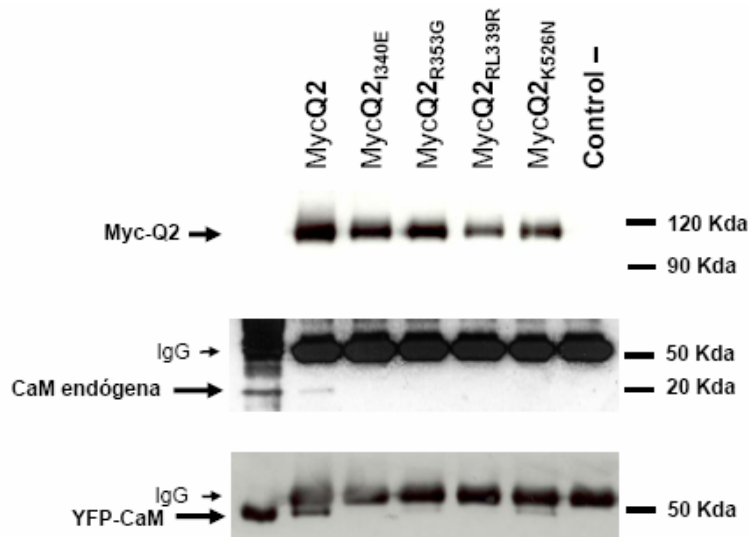


Figura 24. Células HEK293T fueron transfectadas con la subunidad Q2 salvaje y diferentes mutantes puntuales etiquetadas con Myc y calmodulina etiquetada con YFP. Los extractos de las células fueron inmunoprecipitados con anti-myc y revelados con anti-myc y anti-CaM. El control negativo corresponde a células transfectadas sólo con YFP-CaM. Las mutaciones reducen la afinidad del canal por CaM.

Los canales Q2 homoméricos con las diferentes mutaciones no fueron capaces de coimmunoprecipitar CaM endógena o por lo menos no lo hicieron en niveles detectables. Debido a que los niveles de calmodulina endógena eran muy bajos, sobreexpresamos CaM etiquetada con la YFP (*yellow fluorescent protein*) en el extremo N-terminal para aumentar la cantidad de calmodulina disponible, facilitar su detección y poder detectar uniones más débiles. Además, la fluorescencia de la calmodulina etiquetada nos ayudó a evaluar la eficiencia de la transfección. El canal Q2 homomérico unió YFP-CaM así como la CaM endógena, pero los niveles de unión tras la sobreexpresión fueron mayores. En estas condiciones los mutantes Q2_{R353G} y Q2_{K526N} mostraron unión a YFP-CaM pero más débil que la del Q2 salvaje, un 12% y un 47% respectivamente (el porcentaje de CaM inmunoprecipitada se calculó con respecto a la cantidad de subunidad Q2 arrastrada; n =

2). La interacción con CaM de canales $Q2_{R353G}$ ha sido anteriormente estudiada mediante doble híbrido y la eficiencia de la interacción se vio notablemente reducida (Richards et al., 2004). Las mutaciones $Q2_{L339R}$ y $Q2_{I340E}$ no fueron capaces de inmunoprecipitar CaM endógena ni tampoco YFP-CaM sobreexpresada.

Como el canal es un tetrámero hay que tener en cuenta que la mutación introducida está presente en las cuatro subunidades que forman el canal. ¿Que pasa con la unión de CaM cuando las subunidades mutantes se ensamblan con subunidades Q3 salvajes? Para evaluar la unión a CaM en canales heteroméricos las células HEK293T fueron transfectadas con Myc-Q2 salvaje, HA-Q3 y YFP-CaM (Figura 25).

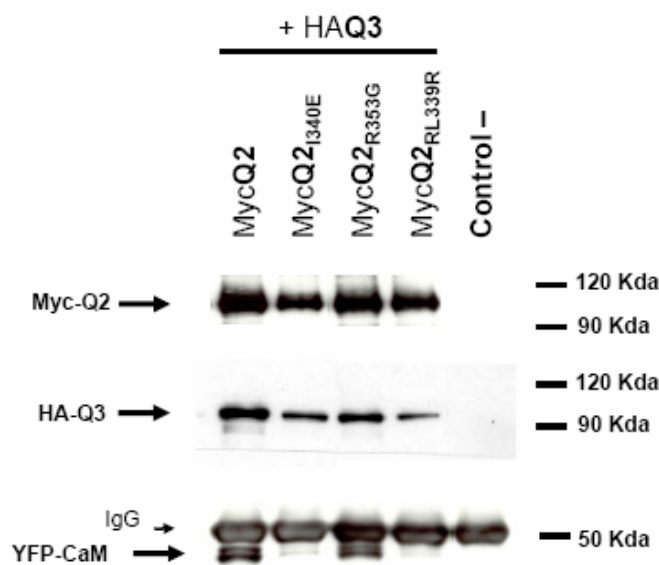


Figura 25. Células HEK293T fueron transfectadas con la subunidad Q2 salvaje y diferentes mutantes puntuales etiquetadas con Myc, Q3 etiquetado con HA y CaM etiquetada con YFP. Los extractos de las células fueron inmunoprecipitaciones con anti-myc y revelados con anti-myc, anti-HA y anti-CaM. El control negativo corresponde a células transfectadas sólo con YFP-CaM. Mutaciones en Q2 reducen la interacción de CaM con canales Q2/Q3.

Por una parte, las subunidades Q2 mutantes fueron capaces de ensamblarse con Q3 de la misma forma que la subunidad salvaje, confirmando los resultados que habíamos obtenido mediante electrofisiología. Por otra, aunque los sitios de unión a CaM de Q3 permanecen intactos la unión a CaM se vio muy comprometida. El mutante $Q2_{R353G}$ inmunoprecipitó CaM en canales heteroméricos con un 50 % menos de eficacia que el canal salvaje y canales con las mutaciones $Q2_{I340E}$ y $Q2_{L339R}$ dieron una señal muy débil de unión a CaM.

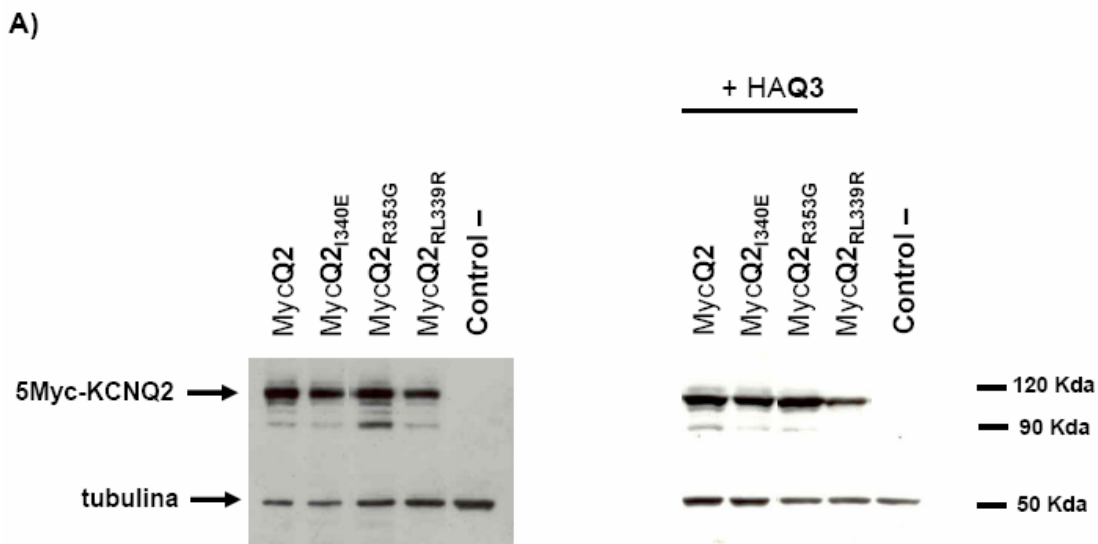
La reducción en expresión en superficie de los mutantes Q2_{L339R}, Q2_{R353G} y quizá Q2_{K526N} podría estar relacionada con la pérdida de unión a CaM. En el laboratorio se han analizado un amplio repertorio de mutantes y deleciones que destruyen la unión a CaM de la subunidad Q2 y consistentemente disminuyen el número de canales Q2/Q3 en la membrana plasmática (Irene Santana).

La unión de CaM a canales heteroméricos podría diferir de la unión a canales homoméricos Q2, ya que la CaM inmunoprecipitada de canales Q2/Q3 aparece una doble banda ausente en la inmunoprecipitación con la subunidad Q2 expresada por sí misma (ver Figura 21 y 22). Estas dos bandas podrían corresponder a CaM unida a Ca²⁺ y apoCaM que presentan diferente movilidad electroforética.

La interacción con subunidades auxiliares puede estabilizar los canales promoviendo su expresión en superficie. Para investigar si la CaM podría desempeñar un papel en la estabilidad de los canales Q2/Q3 se midieron los niveles proteicos de las subunidades mutantes Q2 que no unen CaM etiquetadas con myc expresadas por sí mismas y coexpresadas con Q3 en células HEK293T. Se realizaron western-blot anti-myc con los extractos totales de las células transfectadas con los canales y se utilizó los niveles de expresión de α -tubulina como control interno (Figura 26).

En el caso de canales homoméricos Q2_{L339R}, Q2_{R353G} y Q2_{I340E} los niveles de expresión se redujeron en un 50% respecto a canales homoméricos Q2 salvajes. Sin embargo, la coexpresión con Q3 aumentó la estabilidad de los canales mutantes de forma que la subunidad Q2_{R353G} mostró niveles proteicos similares a los de la subunidad Q2 salvaje y las subunidades mutantes Q2_{I340E} y Q2_{L339R} mostraron un 25% de reducción en sus niveles de expresión. Los resultados indican que la reducción en expresión en superficie provocada por las subunidades Q2_{L339R}, Q2_{R353G} y Q2_{K526N} no se deben a la reducción de los niveles de proteína. La reducción del 25% observada en la subunidad Q2_{L339R} no explicaría una reducción en expresión en superficie del 80%. Por lo tanto, el mecanismo responsable de la reducción en corriente producida por estas mutaciones debe ser la disfunción en el tráfico de los canales a la membrana o su posterior reciclaje.

Por otro lado, la reducción del 50% de niveles proteicos en canales homoméricos Q2 mutantes sugiere que la CaM podría desempeñar un papel en la estabilidad de canales homoméricos Q2. La coexpresión con Q3 aumentó los niveles proteicos sugiriendo que la heteromerización también podría estar involucrada en la estabilidad del canal.



B)

Niveles de expresión de proteína		+ Q3
Q2 _{I340E}	0.56 ± 0.1	0.72 ± 0.15
Q2 _{L339R}	0.46 ± 0.11	0.75 ± 0.06
Q2 _{R353G}	0.47 ± 0.07	1.14 ± 0.27
Q2 _{K526N}	1.12 ± 0.09	

Figura 26. A) Western-blot representativo de extractos totales de células HEK293T transfectadas con las subunidades indicadas en cada línea, derecha canales homoméricos Q2 e izquierda canales heteroméricos. Como control de carga se utilizó la tubulina. **B)** Medias de niveles de expresión de subunidad Q2 salvaje y mutantes calculados con respecto a la señal de α -tubulina ($n \geq 3$). Los datos fueron normalizados tomando como valor de 1 el valor obtenido para el canal salvaje (Q2 o Q2/Q3). Las mutaciones en Q2 que disminuyen la unión a CaM reducen los niveles proteicos pero la coexpresión con Q3 las estabiliza.

La mutación Q2_{K526N} altera la regulación de la corriente ejercida por CaM.

Los datos obtenidos con el mutante Q2_{K526N} resultan contradictorios y no explican la hiperexcitabilidad producida en pacientes con BFNC. El estudio funcional previo de esta mutación en células CHO (Borgatti et al., 2004) tampoco muestra cambios en la amplitud, pero observan un descenso en la sensibilidad a voltaje que podría explicar la reducción en la corriente M que reduciría la repolarización neuronal. Dicho mecanismo ha sido

propuesto para explicar el fenotipo epiléptico asociado a mutaciones en el sensor de voltaje S4 en Q2 en familias afectadas con BFNC (Castaldo et al., 2002; Dedek et al., 2001). Sin embargo, estas observaciones no proporcionan una explicación definitiva para el amplio espectro fenotípico de la familia, que incluye encefalopatía epiléptica, retraso mental, cuadriparesis espástica (disfunción del control del movimiento corporal y rigidez muscular) y síndrome cerebelar.

El número de canales $Q2_{K526N}/Q3$ en membrana podría estar reducido y la eficacia de su unión a CaM está comprometida, sin embargo, estas disfunciones no parecen tener consecuencias funcionales (no se observó reducción en corriente). La sobreexpresión de CaM reduce la corriente basal de canales Q2/Q3 expresados en células CHO (Gamper and Shapiro, 2003). Esta reducción se ha atribuido a la inhibición de la corriente por Ca^{2+} mediada por CaM. Nos preguntamos si esta regulación ejercida por CaM se vería afectada en canales que contenían la mutación $Q2_{K526N}$. Se compararon las corrientes registradas en ovocitos de *Xenopus* en grupos con canales $Q2_{K526N}/Q3$ o Q2/Q3 con y sin CaM sobreexpresada (Figura 27). Los canales heteroméricos Q2/Q3 mostraron una reducción del 50% al sobreexpresar CaM, sin embargo, el canal con la mutación $Q2_{K526N}/Q3$ se redujo sólo en un 80% (la reducción no es estadísticamente significativa). La calmodulina endógena podría ejercer una inhibición basal en la corriente de Q2/Q3 ausente en canales con la mutación K526N, de forma que aún habiendo menos canales $Q2_{K526N}/Q3$ en la membrana los niveles de corriente no se ven alterados. La mutación K526N puede producir canales funcionalmente heterogéneos debido a la posible modulación diferencial por CaM que puede existir en diferentes regiones del cerebro. Por un lado, con poca CaM disponible podría reducirse la corriente como resultado de un descenso en la expresión en superficie y por otro, un aumento en la corriente como consecuencia de la reducción de la inhibición por CaM.

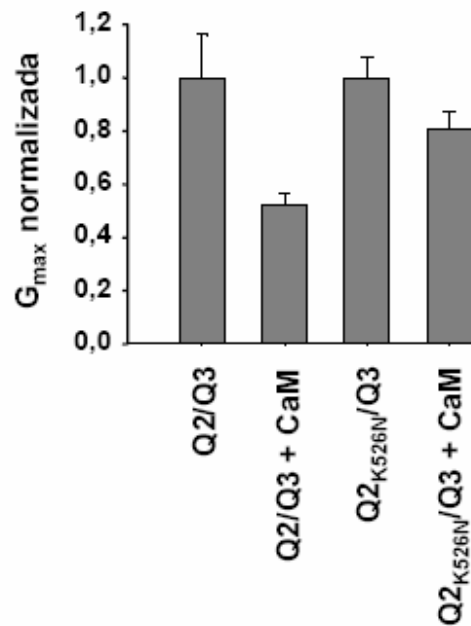


Figura 27. Se registraron corrientes en ovocitos de *Xenopus* que expresaban canales Q2_{K526N}/Q3 y canales salvajes Q2/Q3 con CaM sobreexpresada y sin ella. Las barras indican las medias de conductancias máximas normalizadas con respecto al control Q2/Q3 ($n \geq 8$). Los parámetros de Boltzmann obtenidos de la relación corriente voltaje fueron: Q2/Q3 $V_{1/2} = -29.8 \pm 0.9$, $S = 8.7 \pm 0.3$; Q2/Q3 + CaM (1:1:1) $V_{1/2} = -32 \pm 0.9$, $S = 7.5 \pm 0.3$; Q2_{K526N}/Q3 $V_{1/2} = -29.1 \pm 1.1$, $S = 8.12 \pm 0.1$; Q2_{K526N}/Q3 + CaM (1:1:1) $V_{1/2} = -34 \pm 1.7$, $S = 8 \pm 0.2$.

En resumen, las mutaciones puntuales identificadas en pacientes con epilepsia hereditaria localizadas en la región C-terminal de Q2 reducen la corriente de canales heteroméricos en un 80-90% excepto la mutación Q2_{K526N}. Esta reducción puede ser explicada por un descenso en el número de canales en membrana en el caso de las mutaciones Q2_{L339R}, Q2_{R353G} y Q2_{R553Q}. Esta última se localiza en la hélice C de Q2 que constituye la región identificada como necesaria para promover la expresión en superficie de la subunidad Q3. Por tanto el residuo R553 podría ser un residuo crítico en este proceso. Por otra parte, la interacción del canal con CaM podría estar involucrada en el tráfico a la membrana y la alteración de la interacción canal-CaM su disfunción podría ser la causa de la pérdida de función provocada por las mutaciones Q2_{L339R} y Q2_{R353G}. La mutación Q2_{K526N} aunque no produce efectos aparentes en la amplitud de la corriente ni en sus propiedades biofísicas, la pérdida en la regulación por CaM podría subyacer al complejo fenotipo observado en los pacientes. Por último la reducción en corriente producida por la mutación Q2_{R333Q} no se puede explicar con un descenso en la expresión en superficie. Los sitios de unión a PIP₂ se caracterizan por residuos cargados

positivamente que median la interacción electrostática entre el PIP₂ y el canal. Es por tanto posible, que esta mutación que se localiza en la hipotética región de unión a PIP₂ altere la afinidad del canal a este fosfolípido reduciendo la corriente.



Discusión

El número de genes que codifican subunidades de canales iónicos, sus posibles combinaciones y la asociación con proteínas accesorias proporciona un amplio repertorio de posibilidades. El repertorio de canales seleccionado determinará la propiedad más importante de una neurona, su excitabilidad. ¿Como selecciona la célula entre todas las posibles combinaciones de subunidades que forman el canal y sus estequiometrías? Parece que la respuesta está codificada, en parte, en la secuencia de las propias subunidades.

Un residuo del poro convierte a Q3 en una subunidad silenciosa.

La expresión heteróloga de la subunidad Q3 en ovocitos de *Xenopus* u otros sistemas de expresión produce corrientes que apenas son detectables y las señales de canales Q3 homoméricos en la membrana plasmática se confunden con los niveles de fondo. La subunidad Q3 se puede emparejar con otros miembros de la familia (Q2, Q4 y Q5) aumentando su expresión y cambiando sus propiedades biofísicas (Lerche et al., 2000; Schroeder et al., 2000). Concretamente, la coexpresión de Q3 con Q2 potencia la corriente unas 10 veces y, aumenta los niveles de expresión en superficie de ambas subunidades (Schwake et al., 2000) y cambia la sensibilidad al bloqueante TEA.

El análisis exhaustivo de quimeras y mutaciones puntuales ha revelado a un residuo del poro (A315) es responsable de los bajos niveles de corriente de la subunidad Q3. Este residuo está muy conservado en la familia KCNQ. Todos los demás miembros muestran una T en esta posición.

↓

```

KCNQ2 252 LAEKGE.....NDHFDTYADALWWGLITLTTIGYGDKYPQTWNGRLL293
KCNQ3 285 LVEKDVPEVDAQGEEMKEEFETYADALWWGLITLATIGYGDKTPKTWEGRLI336
KCNQ4 288 LAEKDA.....NSDFSSYADSLWWGTITLTTIGYGDKTPHTWLGRVL299
KCNQ5 251 LVEKDA.....NKEFSTYADALWWGTITLTTIGYGDKTPPLTWLGRLL292
KCNQ1 187 LAEKDAVN....ESGRVEFGSYADALWWGVVTVTTIGYGDKVPQTWVGKTI243

```

La mutación puntual de este único residuo del poro de Q3 por su equivalente en Q2, Q3_{A315T}, produce corrientes homoméricas Q3 incluso mayores que las registradas con canales heteroméricos Q2/Q3. Este aumento viene acompañado de un incremento en expresión en superficie de la subunidad Q3 mutada que alcanza un 60% del nivel observado para los canales Q2/Q3. La mutación equivalente en Q2, Q2_{T276A}, convirtió a la subunidad Q2 en silenciosa incluso al ser coexpresada con Q3. Estos resultados indican que el residuo del poro A315 es responsable de los bajos niveles de corriente de canales homoméricos Q3 y de la ineficiente expresión en superficie de esta subunidad.

Un residuo localizado en el poro del receptor de AMPA, en una posición anterior a

Q3_{A315}, que es susceptible de sufrir retoque (“*editing*”) del ARNm, controla el ensamblaje de los dímeros en tetrámeros y, por tanto, su expresión en la membrana plasmática (Greger et al., 2003). Estudios de mutagénesis indican que la conformación general del lazo del poro afecta al ensamblaje, ya que alteraciones en varias posiciones reducen la tetramerización del canal. De forma similar el residuo del poro Q3_{A315} podría impedir la formación de tetrámeros Q3 reduciendo su expresión en superficie. La coexpresión con Q2 (con T en esa posición) permitiría a Q3 incorporarse en los tetrámeros y expresarse en la membrana plasmática de forma eficaz.

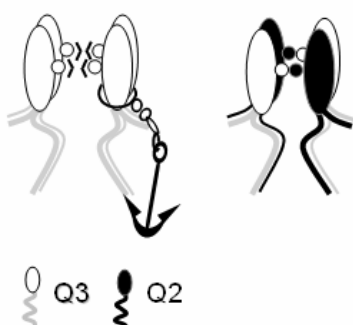


Figura 1. Un aminoácido de Q3, A315, localizado en el vestíbulo del poro simbolizado como un círculo, evita la expresión en membrana de canales homoméricos Q3. Este mecanismo podría basarse en el ensamblaje ineficiente de cuatro subunidades Q3. El ensamblaje con subunidades Q2 que contienen el residuo T276 equivalente revertiría este efecto permitiendo el tráfico a la membrana.

La discriminación del bloqueante TEA entre las diferentes subunidades KCNQ, permite elucidar la identidad de las subunidades que forman el tetrámero funcional. La expresión heteróloga de las subunidades Q3 y Q2 produce una única población de canales heteroméricos compuestos por las dos subunidades (con sensibilidad intermedia a TEA $IC_{50} \sim 4$ mM; (Hadley et al., 2003). La comparación de la expresión de las dos subunidades con la de una construcción Q2-Q3 en tandem concuerdan con la estequiometría 2:2 e indica que el ensamblaje no ocurre de forma aleatoria (Hadley et al., 2003). Sin embargo, la coexpresión de Q2 con la subunidad Q3 mutante (Q3_{A315T}) produce corrientes cuya sensibilidad a TEA indica la existencia de dos poblaciones de canales, heteroméricos Q2/Q3_{A315T} ($IC_{50} = 7.1$ mM) y homoméricos Q3_{A315T} ($IC_{50} = 250$ mM). Estos resultados indican que la estequiometría preferencial Q2/Q3 podría estar determinada, al menos en parte, por la retención de las subunidades Q3 en el interior celular mediada por el residuo Q3_{A315} del poro.

La sobreexpresión de Q3 en sistemas heterólogos produce corrientes pequeñas. Sin embargo es factible que *in vivo* esto no ocurra. La corriente M nativa parece estar compuesta predominantemente por canales heteroméricos 2Q2:2Q3, tanto en neuronas del ganglio superior cervical como del hipocampo y del estriado medio (Wang et al., 1998; Selyanko et al., 2002; Shah et al., 2002; Hadley et al., 2003; Shen et al., 2005). Se han

detectado altos niveles de ARNm de Q3 en el hipocampo de ratas adultas (Wang et al., 1998) y en células piramidales (Saganich et al., 2001). Por tanto, parece existir un sistema de control de calidad celular que asegura la formación de canales heteroméricos en exceso de Q3. Por lo menos parte de este sistema podría incluir el residuo del poro Q3_{A315}, que evita su transporte a la membrana en ausencia de Q2. La variación de los niveles de ARNm de Q3 permitiría regular la composición molecular de los canales. Con menos Q3 disponible, como se observa en estadios iniciales del desarrollo, la corriente M registrada parece estar formada por canales 3Q2:Q3 o canales Q2 homoméricos y 2Q3:2Q2 (Shah et al., 2002).

La zona del poro constituye el corazón del canal donde se forma la constricción que coordina el flujo de iones (Doyle et al., 1998). La estructura cristalina del canal de K⁺ bacteriano KcsA muestra que el lazo del poro se encuentra enfrentado en el canal ensamblado. Igualmente, el modelaje molecular indica sitios de contacto próximos entre los lazos P de las subunidades Q2/Q3 (Figura 2). En este contexto sería factible que el cambio de algún residuo en este lazo afectara al ensamblaje.

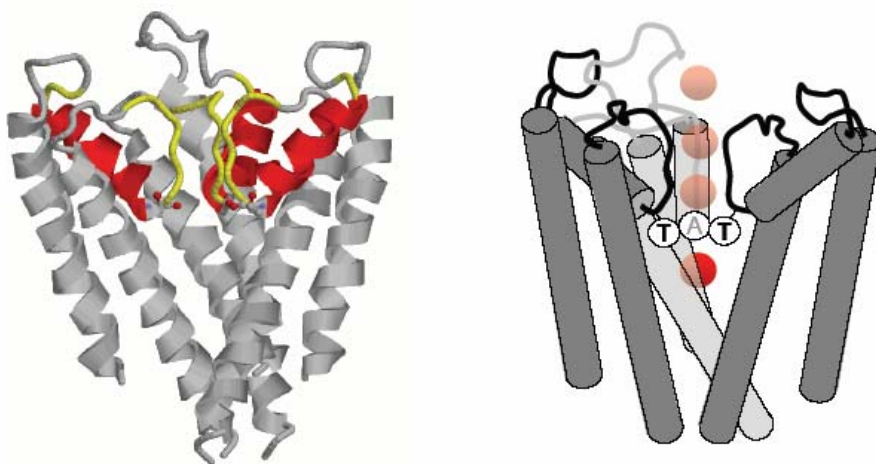


Figura 2. Derecha, modelo de homología de la zona del poro de un canal Q2/Q3 basado en la estructura cristalina del canal KcsA (Doyle et al., 1998). No se muestra una subunidad Q3 para simplificar el dibujo. Cada subunidad comprende el segmento S5 seguido del poro y el segmento S6. A la izquierda se muestra una simplificación indicando la posición del residuo Q3_{A315} y Q2_{276T}. Los iones de K⁺ se representan como círculos grises.

La comparación de la secuencia de los 75 canales humanos conocidos (Gutman et al., 2003) revela que la posición del residuo del poro de Q2/Q3 involucrado en el tráfico a la membrana está muy conservada, 66 de ellos tienen una treonina. La única subunidad que tiene una alanina en esa posición además de Q3 es la subunidad K_{ir}3.1 o GIRK1 (A142) de

la familia de canales de potasio rectificadores de entrada. Esta subunidad, de forma similar a Q3, no produce canales homoméricos funcionales (Chan et al., 1996). Sin embargo, se asocia con los demás miembros de la familia, que contiene una T, aumentando su actividad y alterando sus propiedades de canal único. La subunidad $K_{ir}3.1$ expresada por si sola se retiene en el RE y su ensamblaje con $K_{ir}3.4$ potencia la corriente y aumenta su expresión en superficie (Kennedy et al., 1999). Las similitudes entre $K_{ir}3.1$ y Q3 son por lo menos, llamativas, sin embargo hasta la fecha no se conoce el papel que juega este residuo en la subunidad $K_{ir}3.1$.

↓

$K_{ir}3.1$	NVYNFPSAFLFFIETE A TIGYGYRYITDKCPEGI
$K_{ir}3.2$	NLNGFVSAFLFSIETETTIGYGYRVITDKCPEGI
$K_{ir}3.3$	NLNGFVAAFLFSIETETTIGYGHRVITDQCPEGI
$K_{ir}3.4$	NLSGFVSAFLFSIETETTIGYGFRVITEKCPEGI


Figura 3. Alineamiento de la secuencia del poro de las subunidades de la familia Kir3 o GIRK. La subunidad $K_{ir}3.1$ que no forma canales homoméricos y se retiene en el RE, tiene una A en la misma posición que la subunidad Q3, mientras que los demás miembros de la familia contienen una T en esta posición.

Residuos localizados en la región del poro de los canales $Kv1.1$ han sido involucrados en el tráfico del canal (Manganas et al., 2001; Zhu et al., 2001; Zhu et al., 2005), pero no existen resultados concluyentes que identifiquen los residuos responsables y el mecanismo por el cual actúan. Aunque la transfección de la subunidad $Kv1.1$ produce corrientes, la gran mayoría de la proteína se localiza en el RE y poblaciones de $Kv1.1$ de membrana son indetectables mediante métodos bioquímicos e inmunocitoquímicos (Manganas and Trimmer, 2000). *In vivo* parece que los canales $Kv1.1$ no forman canales homoméricos, sino que forman parte de canales heteroméricos en el SNC humano (Coleman et al., 1999). El alineamiento de la secuencia del poro de la familia $Kv1$ muestra también un residuo T muy conservado en la región del poro que difiere en la subunidad $Kv1.1_{S369}$ (Figura 4). Este residuo se localiza dos posiciones antes de la que corresponde a la A315 de Q3. La mutación puntual $Kv1.1_{S369T}$ es suficiente para promover la expresión en superficie de este canal (Zhu et al., 2001). La subunidad $Kv1.2$ también muestra una S en la misma posición que $Kv1.1$ y sin embargo es capaz de formar canales homoméricos. Con lo que respecta a su localización intracelular parece ser bastante confusa ya que aunque se detecta en superficie, un 70-80 % de la proteína total se localiza en el RE (Manganas and Trimmer, 2000).

Una tercera parte de las subunidades Kv no forman canales homoméricos ($Kv5.1$,

Kv6.1-6.4, Kv8.1-8.2 y Kv9.1-9.3) pero interactúan selectivamente con miembros de la subfamilia Kv2 (Hugnot et al., 1996), Kv3 (Salinas et al., 1997) y Kv4 (Jegla and Salkoff, 1997), formando canales con propiedades funcionales únicas que se asemejan a diversos canales nativos (e.j. Patel et al., 1997). Se les llama subunidades silenciosas o auxiliares. Se ha estudiado la localización subcelular de la mayoría de ellas y se localizan en el RE (Salinas et al., 1997; Ottschytsch et al., 2002; Ottschytsch et al., 2005). La coexpresión de las subunidades silenciosas con Kv2.1 las rescata del ER y transporta los canales heteroméricos a la membrana (Salinas et al., 1997; Ottschytsch et al., 2002). Todavía se desconoce porqué estas subunidades cuando se expresan solas permanecen en el RE. El alineamiento de la región del poro de la familia Kv indica que las subunidades silenciosas contienen una S (excepto Kv5.1 y Kv6.1) en la misma posición de la S369 de Kv1.1, mientras que las subunidades de la familia Kv2, Kv3 y Kv4 contienen una T en la misma posición (Figura 4). El intercambio de la región del poro de una subunidad funcional por el poro de subunidades silenciosas (Kv6.3 y Kv9.3) las convierte en canales no funcionales (Stocker et al., 1999; Ottschytsch et al., 2005).

Localización RE



	+	Kv1.1	AEAEAAESH.....FSSIPDAFWWAVV S MTTVGYGDMYPVTIGGK	
	+/-	Kv1.2	AEADERDSQ.....FPSIPDAFWWAVV S MTTVGYGDMVPTTIGGK	
	-	Kv1.3	AEADDPSSG.....FNSIPDAFWWAVVTMTTVGYGDMHPVTIGGK	
	-	Kv1.4	AEADEPTTH.....FQSI PDAFWWAVVTMTTVGYGDMKPI TVGGK	
		Kv1.6	AEADDVDSL.....FPSIPDAFWWAVVTMTTVGYGDMYPMTVGGK	
	-	Kv2.1	AEKDEDDTK.....FKSIPASFWWATITMTTVGYGDIYPKTLLGK	
		Kv2.2	AEKDEDATK.....FTSIPASFWWATITMTTVGYGDIYPKTLLGK	
Subunidades silenciosas	{	?	Kv5.1	MEQSQPETL.....FKSIPQSFWWAII TMTTVGYGDIYPKTLLGK
		?	Kv6.1	IENEMADSPE.....FTSIPACYWWAVITMTTVGYGDMVPRSTPGQ
		?	Kv6.2	AERELGARRD.....FSSVPASYWWAVI S MTTVGYGDMVPRSLPGQ
		+	Kv6.3	LEHGLDLETSNKD.....FTSIPAAACWWVII S MTTVGYGDMYPITVPGRI
		+	Kv6.4	AEKESGRVLE.....FTSIPASYWWAII S MTTVGYGDMVPRSVPGQ
		+	Kv8.1	AEQSIPDIT.....FTSVPCAWWWATT S MTTVGYGDIRPDTTTGK
		+	Kv8.2	VEHDVPSTN.....FTTIPHSWWAAV S ISTVGYGDMYPETHLGR
		+	Kv9.1	AE.EENEG.....FHTIPACWWWGTV S MTTVGYGDVVPETVGGK
		+	Kv9.2	IEKEENEG.....LATIPACWWWATV S MTTVGYGDVVPETTAGK
		+	Kv9.3	VEKDELAS....S....LTSIPICWWWATI S MTTVGYGDTHPVTLAGK
	-	Kv3.1	AERIGAQPNDPSASEHTHFKNIPIGFWWAVVTMTTLGYGDMYPQTWSGM	
		Kv3.2	AERIGAQPNDPSASEHTHFKNIPIGFWWAVVTMTTLGYGDMYPQTWSGM	
		Kv3.3	AERIGADPDDILGSNHTYFKNIPIGFWWAVVTMTTLGYGDMYPKTWSGM	
		Kv3.4	AERIGARPSDPRGNDHTDFKNIPIGFWWAVVTMTTLGYGDMYPKTWSGM	
	-	Kv4.1	AEKGTSTN.....FTSIPAAFWYITVMTTLGYGDMVPTIAGK	
	-	Kv4.2	AEKGSSASK.....FTSIPAAFWITYVTMTTLGYGDMVPTIAGK	
	-	Kv4.3	AEKGSSASK.....FTSIPASFWYITVMTTLGYGDMVPTIAGK	

Figura 4. Alineamiento de la secuencia del poro de las subunidades de la familia Kv. Las subunidades que se retienen en el RE expresadas por si solas contienen una Serina, indicada con una flecha, en una posición conservada en el resto de la familia. La posición del residuo Q3A315 se indica con un triángulo.

Cuatro subunidades deben asociarse para formar un canal de potasio funcional, pero sólo pueden ensamblarse las subunidades compatibles de una misma familia (Li et al., 1992). En los canales Kv se han identificado dominios que determinan el ensamblaje selectivo entre subunidades específicas (Li et al., 1992; Schwake et al., 2003), restringiendo las posibilidades a ciertas combinaciones. Sin embargo, una misma subunidad puede formar canales homoméricos o subunidades compatibles pueden ensamblarse para formar canales heteroméricos. Entonces, ¿qué gobierna el ensamblaje heterotetramérico *versus* homomérico con el mismo dominio de ensamblaje? En la mayoría de los tejidos existen canales heteroméricos con propiedades específicas que son críticas para el funcionamiento correcto de la célula. Son por lo tanto de gran relevancia los principios que determinan el autoensamblaje o la heteromerización. El mecanismo por el cual residuos del poro convierten a ciertas subunidades en silenciosas (que no forman homómeros) y restringe su presencia a canales heteroméricos, podría constituir un mecanismo general en los canales de K⁺.

El poro de la subunidad Q3 podría formar el sitio de unión de un bloqueante endógeno.

Todas las construcciones con la región del poro de Q3 y más concretamente con el residuo A315 localizado en el poro no fueron capaces de producir corrientes detectables. Los resultados indican que este residuo disminuye la expresión en superficie de Q3 reduciendo por consiguiente los niveles de corriente. Sin embargo, canales quiméricos con la región transmembranal de Q3 (con A315) y la región C-terminal heteromérica (N3T3C2/Q3; N2T3C2/Q3) eran capaces de alcanzar la membrana aunque los niveles de corriente eran similares a los obtenidos con Q3. Una explicación, poco probable, sería que estas quimeras llegaran a la membrana en forma de dímeros en lugar de tetrámeros y no fuesen por tanto, funcionales. Otra posibilidad sería que el residuo A315 podría formar parte del sitio de unión a un bloqueante interno que impidiera el paso de iones de K⁺. La mutación puntual Q3_{A315T} además de permitir la expresión en superficie de la subunidad Q3 destruiría el sitio para el posible bloqueante. Para verificar esta hipótesis se registraron parches de ovocitos que expresaban los canales quiméricos capaces de alcanzar la membrana pero con niveles de corriente muy inferiores a los esperados (N3T3C2/Q3). La escisión de estos parches, que expone la cara intracelular del canal al medio de registro, produjo un aumento en la corriente. Este aumento es consistente con el lavado de algún factor intracelular que bloqueara la corriente.

La región donde se localiza el residuo del poro A315 de Q3 está implicada en la unión a diversas drogas y bloqueantes en otros canales. El análisis de mutantes en Q2 y canales *shaker* parece consistente con la participación de este sitio del poro en el bloqueo intracelular por iones (Yellen et al., 1991; Zhou et al., 1996; Alagem et al., 2001; Prole and Marrion, 2004). El correspondiente residuo T263 en los canales hEAG es crítico en el bloqueo por drogas antiarrítmicas (Mitcheson et al., 2000). En KCNQ1, determinantes importantes para el bloqueo del canal por benzodiazepina se encuentran próximos en la secuencia aminoacídica (Seebohm et al., 2001a). El sitio de unión de anestésicos como la bupivacaina a los canales K_v se sitúa en el vestíbulo interno del poro (Nilsson et al., 2003). Las poliaminas constituyen un grupo de bloqueantes endógenos naturales que proporcionan la propiedad de rectificar hacia dentro a los receptores de AMPA y kainato (Bowie and Mayer, 1995). El bloqueo por poliaminas en los receptores de AMPA ocurre en el sitio Q/R que sufre retoque y que como se ha mencionado anteriormente está implicado en el ensamblaje en tetrámeros de estos receptores (Greger et al., 2003). Si existe un ligando natural para este sitio, los ovocitos de *Xenopus* podrían ser un buen sistema para su identificación porque los niveles de expresión de Q3 son más reducidos que en otros sistemas de expresión.

La heteromerización del C-terminal permite el transporte a la membrana de canales Q2/Q3.

Los canales Q2 y Q3 homoméricos no se expresan de forma eficaz en la membrana, pero la coexpresión de ambas subunidades aumenta su expresión en superficie (Schwake et al., 2000). La coexpresión de subunidades Q3 etiquetadas extracelularmente con subunidades quiméricas Q2/Q3 en ovocitos de *Xenopus* y la posterior cuantificación del número de canales en la membrana, reveló que la región C-terminal de Q2 que comprende las hélices C y D (residuos 553-641) era necesaria para promover la expresión en superficie de Q3 independientemente de la configuración del resto del canal. Las hélices C y D han sido identificadas como el dominio que determina la especificidad en el ensamblaje entre las subunidades KCNQ (denominado como sid o *subunit interacting domain*; (Schwake et al., 2003). La subunidad Q3 puede ensamblarse con las subunidades Q2, Q4 y Q5, pero las demás combinaciones no son posibles. Es decir, las hélices C y D además de determinar las reglas de ensamblaje promueven la expresión de canales Q2/Q3 y podrían jugar un papel similar en canales heteroméricos Q3/Q4 y Q3/Q5.

Un mecanismo común por el que se regula el ensamblaje incompleto de los complejos multiméricos lo constituyen las señales de retención/recuperación codificadas en la secuencia aminoacídica de las subunidades que lo componen. Estas señales de retención/recuperación basadas en arginina (RxR, RxK) pueden retener a las proteínas en el retículo o pueden “pescarlas” en el aparato de Golgi y devolverlas al retículo (Nufer and Hauri, 2003). El ensamblaje con otras subunidades puede enmascarar estas señales y permitir la salida del RE sólo a los complejos con una determinada composición. Los receptores GABA_B ilustran particularmente bien el enmascaramiento estérico, ya que las regiones C-terminales de las dos subunidades que forman el receptor forman dominios tipo trenza (*coiled-coil*) que enmascaran la señal de retención/recuperación presente en una de ellas (Margeta-Mitrovic et al., 2000).

El aumento del tráfico de los canales estimulado por las hélices C y D de Q2 podría deberse a señales de retención presentes en Q3 o en Q2 y Q3, que son enmascaradas tras el ensamblaje. En la hélice C se encuentran agrupaciones de residuos positivamente cargados que se asemejan a señales de retención (KDRTK en Q2 y KHKK en Q3). Esta posibilidad está sustentada por experimentos realizados en el laboratorio (Paloma Aivar) que indican que la eliminación de señales consenso de retención en la subunidad Q2 localizadas entre las hélices C y D aumenta la expresión en superficie de esta subunidad.

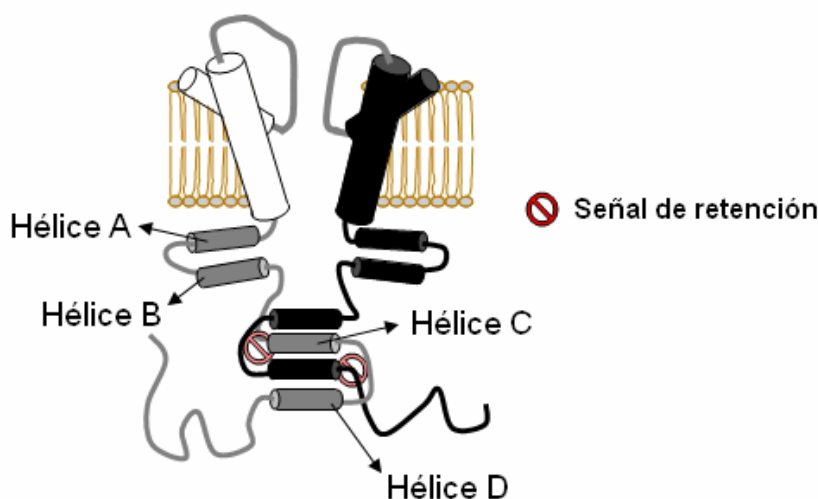


Figura 5. Dibujo esquemático de un canal heteromérico Q2/Q3 mostrando la región del poro y el dominio C-terminal de dos de sus subunidades. La subunidad Q3 se representa en blanco y la subunidad Q2 en negro. La heteromerización de las hélices C y D C-terminales permite la expresión en la membrana plasmática de canales Q2/Q3. El mecanismo responsable de este fenómeno podría ser el enmascaramiento de señales de retención/recuperación presentes en ambas subunidades.

La epilepsia está causada por la hiperexcitabilidad eléctrica en el sistema nervioso central. Disfunciones que reducen la corriente a través de canales de K^+ o la pérdida de canales en la membrana plasmática pueden subyacer a la hiperexcitabilidad neuronal. Más del 50% de las mutaciones que producen epilepsia neonatal en humanos (BFNC) se localizan en la región C-terminal intracelular de la subunidad Q2. Teniendo en cuenta el papel fundamental que juega la región C-terminal en el transporte de los canales a la membrana evaluamos el efecto de varias mutaciones puntuales patogénicas en la corriente y la expresión en superficie en ovocitos de *Xenopus*.

La mutación Q2_{R553Q} (Moulard et al., 2001) se localizada en la hélice C y reduce la corriente de canales Q2_{R553Q}/Q3 en más de un 80% debido a la disminución del número de canales en la membrana. La alteración en el tráfico de los canales no se debe a defectos en el ensamblaje de ambas subunidades, por tanto, la mutación podría producir cambios en la estructura tridimensional que evitaran el enmascaramiento de la posible señal de retención. Para aclarar este punto serían necesarios más experimentos tales como combinar esta mutación con mutaciones de las señales de retención y comprobar que el canal se transporta a la membrana plasmática y produce corrientes similares a las de los canales silvestres.

La alteración de la unión del canal con CaM se asocia con defectos en el tráfico de los canales.

Un mecanismo común por el cual los dominios citoplasmáticos influyen en el tráfico a la membrana es interaccionando con otras proteínas moduladoras. La calmodulina (CaM) se une a la región C-terminal de todos los miembros de la familia KCNQ a través de dos regiones discontinuas (Yus-Nájera et al., 2002). En la hélice A se localiza un motivo IQ de unión a CaM y en la hélice B dos motivos solapados 1-5-10. Las mutaciones Q2_{L339R} (Moulard et al., 2001) y Q2_{R353G} (Richards et al., 2004) identificadas en familias con epilepsia hereditaria redujeron la corriente de canales Q2/Q3 más de un 80% que se correlaciona con una pérdida del número de canales en la membrana plasmática. Ambas mutaciones se localizan en el motivo IQ de unión a CaM, en la hélice A, y reducen la afinidad del canal por CaM tanto en canales homoméricos Q2 como coexpresados con Q3 salvaje. Canales Q2_{R353G}/Q3 arrastraron un 50% menos CaM que los canales salvajes y los Q2_{L339R}/Q3 mostraron una unión muy débil similar a la obtenida con la mutación Q2_{I340E} que destruye la isoleucina del sitio de unión IQ.

Ensayos bioquímicos como electrofisiológicos mostraron que las subunidades Q2 mutantes $Q2_{L339R}$ y $Q2_{R353G}$ se ensamblan con Q3 correctamente y los niveles de proteína total no corresponden con la pérdida de canales en membrana. Por lo tanto, inferimos que la reducción en el número de canales en membrana debe responder a defectos en el proceso de tráfico a la membrana asociada a la disminución de CaM unida al canal. De hecho, la sobreexpresión de un péptido que secuestra CaM (la región de unión a CaM de Q2, mQ2 321-567), en neuronas de hipocampo, reduce la corriente M nativa unas tres veces. Como cabría esperar, estas neuronas muestran hiperexcitabilidad respondiendo a un estímulo despolarizante con múltiples potenciales de acción (Shahidullah et al., 2005). Por tanto, la pérdida de la unión de CaM producida por las mutaciones $Q2_{L339R}$ y $Q2_{R353G}$ podría ser la causa de la hiperexcitabilidad neuronal en los pacientes con BFNC.

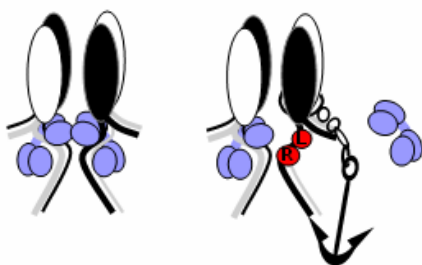


Figura 6. Las mutaciones $Q2_{L339R}$ y $Q2_{R353G}$ identificadas en pacientes con BFNC coexpresadas con subunidades Q3 salvajes reducen la capacidad del canal de unir CaM y el número de canales en la membrana.

Estudios previos no han encontrado una asociación entre la pérdida de unión a CaM de canales homoméricos Q2 y su expresión en membrana (Wen and Levitan, 2002). Esta contradicción en los resultados podía deberse a una modulación diferencial del tráfico de canales Q2 y canales Q2/Q3 por CaM. De hecho, la CaM asociada a canales Q2/Q3 es diferente a la encontrada interaccionando con canales homoméricos Q2. En canales heteroméricos aparece como una doble banda que podría corresponder a apoCaM y a CaM asociada a Ca^{2+} .

¿Por qué mecanismo podría controlar la CaM la expresión en superficie de los canales Q2/Q3?

La asociación de canales iónicos con proteínas andamio/anclaje puede regular la habilidad de las señales de retención y ser por tanto requerida para la expresión en superficie (Scott et al., 2001; Standley et al., 2000). El canal K^{+}_{ATP} es un octámero formado por cuatro subunidades α Kir 6 (Kir 6.1 o 6.2) y cuatro subunidades β SUR1. Cada subunidad contiene una señal de retención que localizan en el RE a los complejos incompletos y solo cuando las ocho subunidades se ensamblan se posibilita la expresión en la membrana del canal (Zerangue et al., 1999). Sin embargo, la asociación del octámero K^{+}_{ATP} con la proteína andamio de la familia 14-3-3 parece un requisito para promover el

tráfico del complejo a la membrana (Yuan et al., 2003). Se desconoce si el enmascaramiento estérico de la asociación de las 8 subunidades de este canal es suficiente para la inactivación de la señal de retención o si por el contrario es la interacción con 14-3-3 el último responsable de la expresión en superficie. Este escenario puede ser bastante general. Los canales KCNK y los receptores nicotínicos también contienen motivos de retención dibásicos y la interacción con 14-3-3 dependiente de fosforilación, permite la exportación del canal (O'Kelly et al., 2002). Proteínas anclaje con dominios PDZ enmascaran una señal de retención presente en la subunidad NR1 del receptor NMDA (Standley et al., 2000). La proteína andamio AKAP regula la expresión en superficie de los canales de Ca^{2+} tipo L antagonizando también con una señal de retención (Altier et al., 2002). Además de estas proteínas andamio la interacción con otro tipo de proteínas como las KCHIP parece enmascarar una señal de retención atípica constituida por residuos hidrofóbicos en el canal Kv4.2 (Shibata et al., 2003). Las proteínas KCHIP pueden unir Ca^{2+} pero ninguna de sus funciones parece ser Ca^{2+} dependiente.

El ensamblaje de las regiones C-terminales de Q2 y Q3 y la interacción con CaM podrían formar parte del mismo mecanismo por el cual se permite la expresión en superficie de los canales heteroméricos: el enmascaramiento de señales de retención. La unión de CaM a las hélices A y B de Q2 y Q3 podría provocar un cambio conformacional en las hélices C y D necesaria para ocultar la o las posibles señales de retención. No obstante, la regulación en otras etapas del transporte a la membrana no puede ser excluida. Es más, las mutaciones analizadas además de producir efectos en la interacción canal-CaM podrían provocar cambios en las interacción con otras proteínas, como la proteína andamio AKAP150, que podría ser el último responsable de los efectos observados.

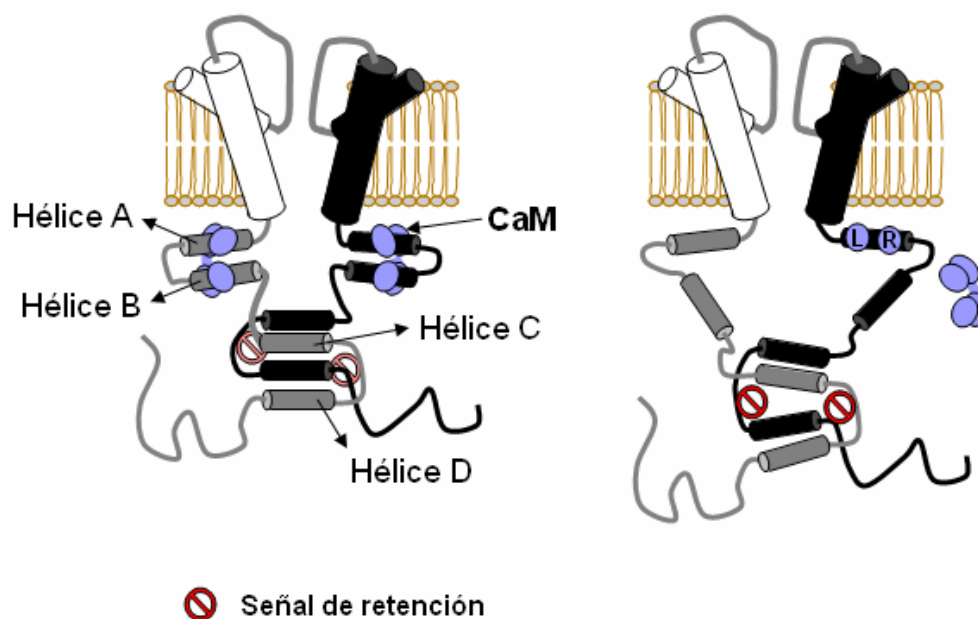


Figura 6. Mutaciones identificadas en una forma de epilepsia hereditaria (Q2_{L339R} y Q2_{R353G}) alteran la interacción de CaM con el canal reduciendo el número de canales presentes en la membrana plasmática. El cambio conformacional del canal producido por la unión de CaM podría participar en el enmascaramiento de señales de retención presentes en las hélices C y D.

Además del enmascaramiento de señales de retención, la interacción con subunidades auxiliares estabiliza las subunidades que forman el poro de canales iónicos (α), promoviendo su expresión en superficie. La asociación entre las subunidades auxiliares Kv β y los canales Kv1.2 ocurre muy pronto durante la biosíntesis en el RE y parece funcionar como una especie de chaperona que estabiliza el canal (Shi et al., 1996). La unión de CaM podría jugar un papel en la estabilidad proteica de las subunidades Q2, al menos en canales homoméricos. Las subunidades Q2 mutantes expresadas por sí solas muestran un 50% de reducción en niveles de expresión. La coexpresión con Q3 estabiliza las subunidades mutantes de forma que los niveles de expresión alcanzan niveles próximos a los obtenidos con la subunidad salvaje. Un cambio de pauta de lectura en Q2 identificada en pacientes con BFNC, que provoca la sustitución de los últimos 163 aminoácidos (Q2_{2043 Δ T}), reduce la estabilidad proteica de la subunidad Q2 y por tanto los niveles de corriente de los canales Q2/Q3 (Bassi et al., 2005). En este caso la heteromerización también produce un efecto protector reduciendo la tasa de degradación de las subunidades mutantes.

Hasta la fecha, la CaM ha sido implicada en la expresión en superficie de los canales de potasio SK4 activados por Ca²⁺ (Joiner et al., 2001). La CaM parece regular la multimerización del canal y por lo tanto, su posterior expresión en superficie. No parece

ser este el caso en los canales Q2/Q3, ya que subunidades Q2 mutantes que no unen CaM interaccionan con Q3 de forma similar a las subunidades salvajes. La resolución de la estructura de la región de unión a CaM de SK2 unida a Ca^{2+} /CaM muestra que regiones C-terminales adyacentes del canal forman un dímero mediante dos moléculas de CaM. Cada molécula de CaM abraza tres hélices α , dos de una subunidad SK2 y otra hélice α de la subunidad adyacente. La CaM podría unirse a los canales Q2/Q3 a través de subunidades adyacentes, como se ha conservado en los canales SK2, aunque esta unión no sea un requisito para el ensamblaje del canal. Esta hipótesis se sustenta por resultados que indican que mutaciones puntuales introducidas en la hélice A de Q2 (Q2_{I340E}, Q2_{L339R}) destruyen la unión de CaM al heterómero casi por completo. Como los sitios de unión a CaM en Q3 permanecen intactos, así como la hélice B de la subunidad Q2, una pérdida tan dramática puede interpretarse como que una misma molécula de CaM se une a las hélices A y B de subunidades adyacentes Q2-Q3. Ya que los canales homoméricos Q3 parecen inmunoprecipitar menos CaM que los canales Q2 (Wen and Levitan, 2002; Yus-Nájera et al., 2002), lo más probable sería que al destruir la unión Q2-CaM quede muy poca CaM unida al heterómero.

Puesto que la unión de CaM al canal parece depender de Ca^{2+} (Yus-Nájera et al., 2002), surge por tanto la pregunta de si los niveles de Ca^{2+} podrían jugar un papel en el proceso de regulación del tráfico de los canales Q2/Q3 a la membrana. La CaM es una proteína señalizadora que media respuestas celulares a cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular mediante la unión de Ca^{2+} a sus manos EF. La CaM mutante que no es capaz de unir Ca^{2+} en ninguno de sus cuatro manos EF, CaM 1,2,3,4, se une a canales Q2/Q3 de forma similar a la CaM salvaje (Wen and Levitan, 2002; Gamper and Shapiro, 2003). Sin embargo la unión de Ca^{2+} podría provocar cambios conformacionales que regularan la función de la CaM.

Varios mecanismos convergen para facilitar el tráfico de los canales “elegidos”.

El control de calidad que asegura la llegada a la membrana de los canales con la composición adecuada no suele estar basado en un solo mecanismo, sino que varios convergen en el canal “elegido”. El ensamblaje de la subunidad Q2 con Q3 produce varios efectos: Primero, neutraliza el efecto de un residuo del poro de Q3 que podría evitar la formación de tetrámeros Q3. Segundo, el ensamblaje de las hélices C y D C-terminales de Q2 y Q3 junto con la asociación con CaM podría ser necesario para ocultar señales de retención/recuperación. Una vez eliminados los frenos de ambas subunidades, la salida del

RE podría estar facilitada por señales de exportación presentes en el lazo extracelular 5 de la subunidad Q3. Este lazo contiene motivos diácidos y/o agrupaciones de residuos ácidos que promueven el reciclaje de los canales internalizados (EKDVPEVEMKEEFE). La presencia o ausencia de esta secuencia en la subunidad quimérica Q3P2 determina la necesidad de ensamblarse con Q3 para formar canales funcionales.

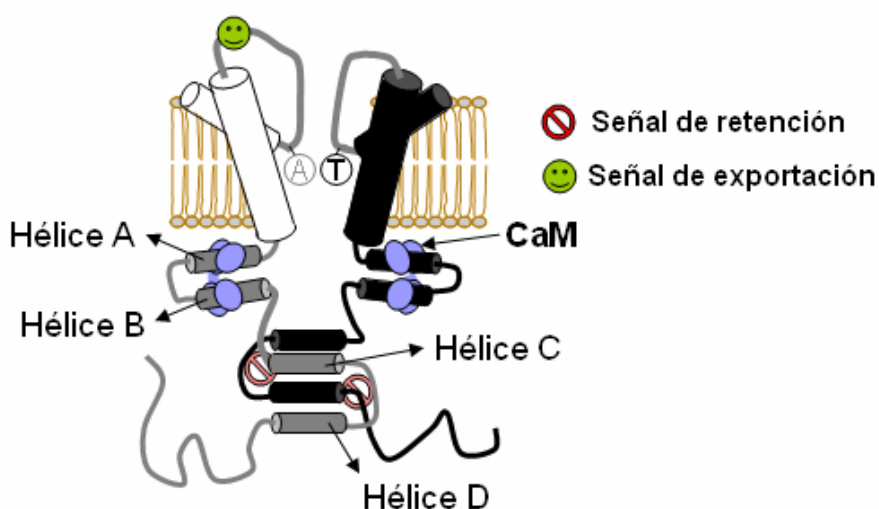


Figura 7. Dibujo esquemático de un canal heteromérico Q2/Q3 mostrando la región del poro y el dominio C-terminal de dos de sus subunidades. El ensamblaje de las dos subunidades permite la expresión en la membrana plasmática de canales Q2/Q3 mediada por varios mecanismos. La subunidad Q2 neutraliza un residuo del poro de Q3 que evita el transporte a membrana, la heteromerización de las regiones C-terminales y la unión a CaM podría enmascarar señales de retención y una señal de exportación localizada en la subunidad Q3 haría el resto para alcanzar los niveles de expresión observados en canales Q2/Q3.

Las regiones intracelulares N y C-terminales podrían controlar la amplitud de la corriente mediante la interacción con PIP₂.

La corriente macroscópica es el resultado de tres factores: el número de canales en la membrana (N), la probabilidad de que se abra el canal (probabilidad de apertura, p) y el flujo de iones a través de él (conductancia unitaria, i).

La región N y C terminal de Q2 ejercen un freno sobre la corriente mientras que el N y C terminal de Q3 la aumentan. Además del control ejercido en el tráfico a la membrana por parte de la región C-terminal, esta región alberga mecanismos que controla las propiedades biofísicas del canal. En la Tabla 1 se resumen los datos de probabilidad de apertura y conductancia publicados hasta la fecha de las diferentes subunidades de la familia KCNQ.

	P_{\max} (0 mV)	i (pS)	Afinidad a PIP_2 (IC_{50})
Q2	0.15	5.8	205
	0.17	17.8	
		6.2	
Q3	0.59	9	2.6
	0.89	18	
		8.5	
Q2/Q3	0.3	9	40
	0.3	8-22	
	0.13-0.3	6.1	
Q4	0.07	2.1	215
Q5	0.17	2.2	

Tabla 1. Valores de conductancia, probabilidad de apertura máxima y afinidad por PIP_2 publicados para las diferentes subunidades de la familia KCNQ (Selyanko et al., 2001); (Schwake et al., 2000); (Tatulian and Brown, 2003); (Li et al., 2004); (Li et al., 2005).

Los valores de conductancia (i) no varían mucho entre las subunidades Q2, Q3 y los heterómeros Q2/Q3, pero no ocurre lo mismo con la probabilidad de apertura máxima (P_{\max}). Se ha propuesto que la afinidad diferente de las subunidades por PIP_2 es responsable de la P_{\max} alcanzadas (Li et al., 2004); (Li et al., 2005). El freno ejercido por la subunidad Q2 se refleja en su probabilidad de apertura reducida y baja afinidad aparente a PIP_2 . Canales Q3 homoméricos muestran alta afinidad aparente por PIP_2 que coincide con sus altos valores de P_{\max} y el aumento en corriente ejercido por las regiones intracelulares de esta subunidad. Se ha postulado que la región C-terminal determina el valor de P_{\max} y media la interacción con PIP_2 . (Zhang et al., 2003; Li et al., 2004; Li et al., 2005). Proponemos que además de la región C-terminal, el N-terminal contribuye a la afinidad por PIP_2 ejerciendo una gran influencia en la P_{\max} alcanzable. Así ocurre en los canales de K^+ rectificadores de entrada, K_{ir} , donde residuos importantes en la interacción con PIP_2 se localizan en las regiones N y C-terminales (Lopes et al., 2002).

La diferencia entre la P_{\max} de Q2 y Q3 permite un aumento en corriente de seis veces que coincide con el aumento observado al reemplazar el N-terminal de Q2 por el de Q3. La hipotética región de interacción del canal con PIP_2 se localiza en la región inmediatamente después del S6 y la componen residuos positivamente cargados que median la interacción electrostática con PIP_2 (Zhang et al., 2003). En la región N-terminal

anterior al S1 se encuentran también residuos positivamente cargados que podrían estar también involucrados en esta interacción. Al escindir parches de membrana con canales dependientes de PIP_2 se produce un desvanecimiento que dependiendo de la afinidad del canal por PIP_2 será más o menos acusado. Además, la reducción en corriente debida a la pérdida de PIP_2 se refleja en la aceleración de la desactivación del canal. Parches con canales con la región N terminal de Q3 pero que mantienen un C-terminal heteromérico (N3T3C2/Q3) mostraron una reducción en la corriente tras la escisión más moderada que canales Q2/Q3 y la desactivación del canal no sufrió cambios antes y después de la escisión del parche. Estos resultados parecen indicar que estos canales quiméricos presentan una alta afinidad por PIP_2 conferida por la región N-terminal de Q3.

La fosforilación por PKC ocurre en la región C-terminal de la subunidad Q2 y produce un desplazamiento de la sensibilidad a voltaje hacia voltajes positivos (Nakajo and Kubo, 2005). La reducción en corriente observada en canales con la región C-terminal de Q2 en las cuatro subunidades se ve acompañada de un desplazamiento hacia voltajes negativos y podría deberse al aumento del grado de fosforilación basal del canal por PKC. Por el contrario, la configuración C-terminal homomérica Q3 aumenta la corriente, correlacionando con la inexistencia de sitios consenso de fosforilación por PKC y el desplazamiento de la $V_{1/2}$ hacia voltajes positivos. La fosforilación basal en la región C-terminal de Q2 podría reducir la afinidad del canal por PIP_2 . De hecho, la activación de la PKC derivada de la señalización de receptores de Ach facilita la inhibición de la corriente derivada de la depleción por PIP_2 .

El control ejercido por la región N-terminal de las diferentes subunidades coincide con su valor de P_{max} , excepto en el caso de la subunidad Q4 cuyo increíble aumento no coincide con su P_{max} que es muy pequeña. El efecto producido en la corriente por las regiones N-terminales de las subunidades Q2, Q3, Q4 y Q5 correlaciona con la existencia de sitios de fosforilación. Las regiones N-terminales de Q2 y Q5, con sitios consenso para la fosforilación por la proteína quinasa A (PKA) dependiente de AMPc (RxS , donde x es polar), reducen la corriente, mientras que las de Q3 y Q4 la aumentan. La fosforilación por PKA podría afectar a la afinidad del canal por PIP_2 , pero en sentido contrario a la fosforilación por PKC, aumentando la afinidad, como ocurre en los canales Kir1.1 (Liou et al., 1999). Aunque el aumento de los niveles de AMPc intracelular en ovocitos que expresan canales Q2/Q3 provoca un incremento del 50 % (Schroeder et al., 1998) y la subunidad RIBB de la PKA se coimmunoprecipita con canales Q2/Q3 de extractos de cerebro humano (Cooper et al., 2000), la regulación por AMPc de la corriente M en el

sistema nervioso central no ha sido demostrada.

El hecho de que los N-terminal de Q2 y Q5 reduzcan la corriente posibilita tener en los canales heteroméricos Q2/Q3 y Q5/Q3 un rango dinámico más amplio en el que la corriente puede ser regulada.

La reducción de la interacción entre canales y PIP_2 subyace a la pérdida de función de mutaciones en canales K_{ir} que producen el síndrome de Andersen y Bartter (Lopes et al., 2002). La mutación Q2_{R333Q} identificada en pacientes con BFNC se localiza en la hipotética región de interacción con PIP_2 de la región C-terminal. La mutación reduce la corriente en un 80% pero su expresión en superficie no muestra diferencias significativas respecto a los canales salvajes. En general las interacciones proteína- PIP_2 son de naturaleza electrostática (Kavran et al., 1998). La eliminación de una carga positiva en la mutación R333Q podría cambiar la afinidad del canal por PIP_2 reduciendo la corriente.

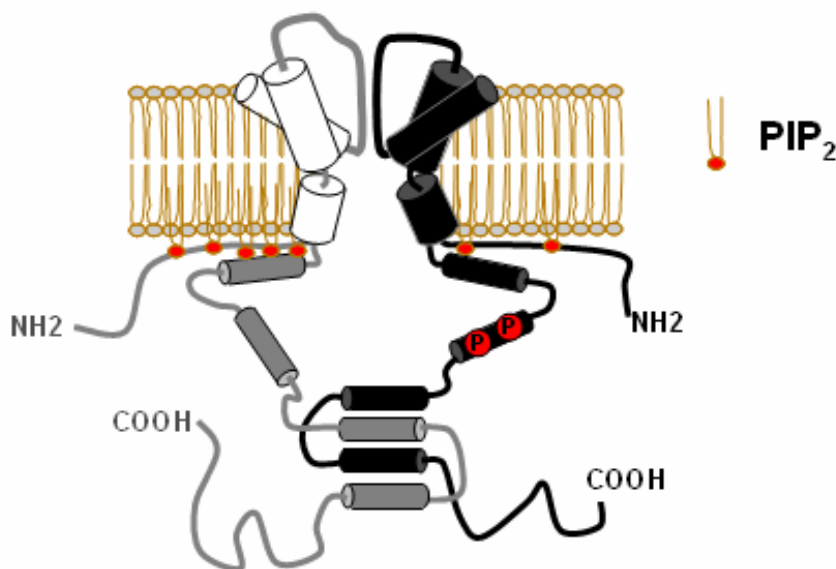


Figura 8. Dibujo del poro y las regiones N y C-terminales de dos subunidades de un canal heteromérico Q2/Q3, donde la subunidad Q3 se representa en blanco y la Q2 en negro. Se postula que las regiones intracelulares N y C-terminales contribuyen a la interacción del canal con PIP_2 . La subunidad Q3 tiene mayor afinidad por el fosfolípido que la subunidad Q2, y los niveles de corriente alcanzados con las regiones N y C-terminales de Q3 son mucho mayores. La fosforilación basal de la región C-terminal de Q2 por PKC podría subyacer a la baja afinidad de la subunidad Q2 a PIP_2 .

La mutación Q2_{K526N} que se asocia con epilepsia y retraso mental afecta a la regulación del canal por calmodulina.

La mutación Q2_{K526N} segrega en una familia italiana asociada en algunos miembros con un fenotipo complejo que incluye epilepsia resistente a drogas, ataques focales y retraso mental (Borgatti et al., 2004). Uno de los miembros de la familia tras los ataques neonatales desarrolló una encefalopatía epiléptica, retraso mental profundo y cuadriparesis espástica (disfunción del control del movimiento corporal y rigidez muscular). Un segundo miembro continuó teniendo ataques epilépticos focales con un moderado retraso mental y un leve síndrome cerebelar. Otros dos miembros de la familia que tuvieron BFNC no presentaron más síntomas.

La epilepsia está fuertemente ligada al retraso mental, un 35-40% de pacientes con retraso mental tienen epilepsia y un 20-30% de epilépticos tienen retraso mental. Se desconoce la causa. Podría ser que un mismo factor (como una infección o una misma causa genética) produzca las dos o que las complicaciones de la epilepsia produzcan el retraso.

Se ha estimado que en uno de cada seis pacientes con mutaciones que provocan BFNC vuelven a aparecer los ataques epilépticos mostrando subsíndromes asociados a epilepsia a veces asociados a disfunciones neurológicas e intelectuales (Singh et al., 2003) y otras condiciones como la mioquinesia (Dedek et al., 2003). La peculiaridad de esta familia radica en el fenotipo tan complejo, mostrando casi todo el espectro de subsíndromes epilépticos descritos antes solo en diferentes familias o en casos esporádicos. La variabilidad fenotípica que acompaña al BFNC se ha atribuido a la interacción entre los defectos genéticos y otros factores de riesgo como el daño cerebral adquirido (Mori et al., 1993; Rogawski, 2000). Sin embargo, la falta de datos que muestren factores de riesgo como responsables de la persistencia de las manifestaciones epilépticas en la familia con la mutación Q2_{K526N} y en otras (Q2_{S247W}; Dedek et al., 2003), apoya la hipótesis formulada por varios autores que otorgan un origen genético del factor de riesgo en lugar de ambiental. El estudio funcional de la mutación Q2_{K526N} en células CHO (Borgatti et al., 2004) no muestra cambios en la amplitud, pero se observa un descenso en la sensibilidad a voltaje que podría reducir la repolarización neuronal (Rogawski, 2000). Sin embargo, estas observaciones no proporcionan una explicación definitiva para el amplio espectro fenotípico de la familia.

Los canales mutantes Q2_{K526N}/Q3 expresados en ovocitos de *Xenopus* mostraron niveles de corriente incluso mayores que los obtenidos con los canales salvajes (aunque el aumento no fue estadísticamente significativo) y no se observaron cambios significativos

en la sensibilidad a voltaje. Como la mutación se localiza en la región de unión a CaM, en la hélice B, analizamos sus consecuencias en esta interacción. La subunidad Q2_{K526N} une CaM con un 50% menos de afinidad que la silvestre. Los resultados con otras mutaciones analizadas muestran una asociación entre la reducción en el número de canales en membrana y la pérdida de CaM unida. La expresión en superficie de los canales Q2_{K526N}/Q3 se reduce en un 50% coincidiendo con la pérdida de CaM unida, sin embargo esta reducción no fue estadísticamente diferente al salvaje. El estudio de expresión en superficie de este mutante llevado a cabo por el grupo de Tagliatela (mediante biotilación de proteínas de membrana) descarta defectos en el tráfico del canal en canales homoméricos Q2_{K526N} (Borgatti et al., 2004). Sin embargo, como se ha comentado anteriormente el efecto de la mutación en el tráfico de canales heteroméricos puede ser diferente al observado en canales homoméricos.

La CaM tiene un efecto dual en la fisiología de los canales Q2/Q3. Por un lado, hemos visto que podría participar en el tráfico de los canales a la membrana y por otro puede modular su función monitorizando los niveles de Ca²⁺. Se ha postulado que niveles de Ca²⁺ basales modulan la corriente de canales Q2/Q3 a través de la CaM endógena y la sobreexpresión de CaM causa inhibición al aumentar la disponibilidad de Ca²⁺/CaM para interaccionar con el canal (Gamper and Shapiro, 2003). La sobreexpresión de CaM redujo la corriente basal de canales Q2/Q3 expresados en ovocitos de *Xenopus* en un 50% como se había observado anteriormente en células CHO y neuronas de SCG (Gamper and Shapiro, 2003). Puesto que la introducción de la mutación Q2_{K526N} en canales heteroméricos produjo una inhibición de tan solo un 20% de la corriente basal. Proponemos que la mutación Q2_{K526N} podría comprometer la regulación de la corriente M mediada por CaM.

Se ha sugerido que los diferentes mecanismos de regulación de los canales Q2/Q3 podrían converger en cambios en la interacción canal-PIP₂. El descenso de los niveles de PIP₂ de la membrana plasmática es el principal responsable de la inhibición de la corriente M por muscarina (Ford et al., 2003; Suh et al., 2004; Suh and Hille, 2002; Zhang et al., 2003). La CaM abraza las hélices A y B que contienen agrupaciones de residuos básicos, que se cree están involucrados en la unión a PIP₂. Diferentes vías de inhibición de la corriente podrían converger en cambios de la afinidad del canal por PIP₂ mediados por CaM. La inhibición de la corriente por Ca²⁺/CaM producida por receptores de bradiquinina podría estar basada en cambios conformacionales que reduzcan la interacción canal-PIP₂.

La mutación Q2_{K526N} podría producir por un lado, una disminución en el número de canales Q2/Q3 en membrana que provocaría una reducción en corriente y por otro, podría alterar la inhibición de la corriente mediada por CaM provocando un aumento de función. Los canales Q2 pueden sufrir una modulación diferencial mediada por CaM en diferentes regiones del cerebro, por lo tanto, la mutación Q2_{K526N} puede producir canales funcionalmente heterogéneos que pueden ser los responsables de las diferentes manifestaciones clínicas y posiblemente de la variabilidad entre individuos.

En resumen, los canales heteroméricos Q2/Q3 son elegidos sobre los homómeros mediante señales escritas en la propia secuencia de ambas subunidades que hacen que se necesiten mutuamente para alcanzar la membrana plasmática. Esta necesidad mutua se refleja también en la funcionalidad del canal donde la subunidad Q3 actúa aumentando la corriente y la subunidad Q2 reduciéndola, dando lugar a corrientes intermedias que podrían permitir regular la corriente en un rango dinámico ampliado.

Los resultados obtenidos en este trabajo plantean varias hipótesis para ser estudiadas en el futuro:

- Comprobar si existe un bloqueante endógeno que interacciona con el poro de Q3. Serían necesarios experimentos de parche escindido dentro-fuera que verifiquen que el lavado de la sustancia endógena aumenta la corriente de canales Q3 y por medio del patch-clamping, volver a insertar el parche escindido en la célula, observar si la corriente vuelve a reducirse. Posteriormente, se abordaría la caracterización de la sustancia endógena responsable del efecto observado.
- Investigar si el residuo del poro A315 de Q3 impide el ensamblaje de tetrámeros Q3 reteniéndolos en el retículo endoplásmico y estudiar si el residuo correspondiente en Q2 neutraliza este efecto. Para ello, se llevaran a cabo ensayos de western blot de geles nativos que identifiquen el estado de oligomerización de las subunidades Q2, Q3 y mutantes puntuales de ambas subunidades y estudios de colocalización mediante microscopía confocal con marcadores de compartimentos subcelulares.
- Estudiar si la región N-terminal junto con la C-terminal median la interacción con PIP2 y el papel de la fosforilación en esta unión. Se realizarían medidas de

sensibilidad a diferentes concentraciones de PIP_2 de corrientes de canales con diferentes regiones N-terminales en parches escindidos y ensayos de interacción con lípidos.

- Identificar las señales de retención C-terminales y verificar que su enmascaramiento es el responsable del aumento en el número de canales tras el ensamblaje de Q2 y Q3. El abordaje experimental consistiría en la mutagénesis de las posibles señales de retención.
- Aclarar el papel que juega la CaM en el proceso de transporte a la membrana. La combinación del secuestro de CaM con canales sin señales de retención deberían responder a la pregunta de si forman parte del mismo proceso o si la CaM participa en otro proceso independiente que controla el transporte a la membrana.

Conclusiones



1. La asociación de las subunidades Q2 y Q3 potencia la corriente debido a varios factores:

- La región transmembrana ejerce un papel preponderante en la potenciación de la corriente. La presencia de un residuo del poro de Q3 localizado en la vía de conducción de iones reduce la corriente a niveles apenas detectables y disminuye la expresión en membrana de canales homoméricos Q3. La asociación con Q2 neutraliza este efecto.
- Parte de la potenciación se debe al incremento en el número de canales en la membrana plasmática y es mediado por el dominio de ensamblaje C-terminal (hélices C y D).
- Las regiones intracelulares N y C-terminales de Q3 aumentan la amplitud de la corriente, mientras que las de Q2 la disminuyen, contribuyendo al fenómeno de potenciación unas dos veces más que el aumento del número de canales en la membrana plasmática.

2. La interferencia de la unión de calmodulina al canal reduce el tráfico de los canales Q2/Q3 a la membrana plasmática. Mutaciones puntuales asociadas a convulsiones neonatales familiares benignas alteran la regulación por calmodulina y el transporte a la membrana de canales Q2/Q3, dando lugar a corrientes reducidas.

Bibliografía



- Abbott,G.W., Goldstein,S.A.N., and Sesti,F. (2001). Do all voltage-gated potassium channels use MiRPs? *Circulation Research* 88, 981-983.
- Alagem,N., Dvir,M., and Reuveny,E. (2001). Mechanism of Ba²⁺ block of a mouse inwardly rectifying K⁺ channel: differential contribution by two discrete residues. *Journal of Physiology-London* 534, 381-393.
- Altier,C., Dubel,S.J., Barrere,C., Jarvis,S.E., Stotz,S.C., Spaetgens,R.L., Scott,J.D., Cornet,V., De Waard,M., Zamponi,G.W., Nargeot,J., and Bourinet,E. (2002). Trafficking of L-type calcium channels mediated by the postsynaptic scaffolding protein AKAP79. *J.Biol.Chem.* 277, 33598-33603.
- An,W.F., Bowlby,M.R., Betty,M., Cao,J., Ling,H.P., Mendoza,G., Hinson,J.W., Mattsson,K.I., Strassle,B.W., Trimmer,J.S., and Rhodes,K.J. (2000). Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature* 403, 553-556.
- Bassi,M.T., Balottin,U., Panzeri,C., Piccinelli,P., Castaldo,P., Barrese,V., Soldovieri,M.V., Miceli,F., Colombo,M., Bresolin,N., Borgatti,R., and Tagliatela,M. (2005). Functional analysis of novel KCNQ2 and KCNQ3 gene variants found in a large pedigree with benign familial neonatal convulsions (BFNC). *Neurogenetics* 6, 185-193.
- Bernard,C., Anderson,A., Becker,A., Poolos,N.P., Beck,H., and Johnston,D. (2004). Acquired dendritic channelopathy in temporal lobe epilepsy. *Science* 305, 532-535.
- Bezánilla,F. (2000). The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiological Reviews* 80, 555-592.
- Bialer,M., Johannessen,S.I., Kupferberg,H.J., Levy,R.H., Loiseau,P., and Perucca,E. (1999). Progress report on new antiepileptic drugs: a summary of the fourth Eilat conference (EILAT IV). *Epilepsy Research* 34, 1-41.
- Biervert,C., Schroeder,B.C., Kubisch,C., Berkovic,S.F., Propping,P., Jentsch,T.J., and Steinlein,O.K. (1998). A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science* 279, 403-406.
- Blackburn-Munro,G. and Jensen,B.S. (2003). The anticonvulsant retigabine attenuates nociceptive behaviours in rat models of persistent and neuropathic pain. *Eur.J.Pharmacol.* 460, 109-116.

- Borgatti,R., Zucca,C., Cavallini,A., Ferrario,M., Panzeri,C., Castaldo,P., Soldovieri,M.V., Baschiroto,C., Bresolin,N., Dalla Bernardina,B., Tagliatela,M., and Bassi,M.T. (2004). A novel mutation in KCNQ2 associated with BFNC, drug resistant epilepsy, and mental retardation. *Neurology* 63, 57-65.
- Bowie,D. and Mayer,M.L. (1995). Inward Rectification of Both Ampa and Kainate Subtype Glutamate Receptors Generated by Polyamine-Mediated Ion-Channel Block. *Neuron* 15, 453-462.
- Brown,B.S. and Yu,S.P. (2000). Modulation and genetic identification of the M channel. *Prog Biophys Mol Biol* 73, 135-166.
- Brown,D.A. (1988). M currents. *Ion Channels* 1, 55-94.
- Brown,D.A. and Adams,P.R. (1980). Muscarinic suppression of a novel voltage-sensitive K⁺ current in a vertebrate neurone. *Nature* 283, 673-676.
- Carroll,R.C., Beattie,E.C., von Zastrow,M., and Malenka,R.C. (2001). Role of AMPA receptor endocytosis in synaptic plasticity. *Nat.Rev.Neurosci.* 2, 315-324.
- Castaldo,P., del Giudice,E.M., Coppola,G., Pascotto,A., Annunziato,L., and Tagliatela,M. (2002). Benign familial neonatal convulsions caused by altered gating of KCNQ2/KCNQ3 potassium channels. *J.Neurosci.* 22, RC199.
- Chakravarthy,B., Morley,P., and Whitfield,J. (1999). Ca²⁺-calmodulin and protein kinase Cs: a hypothetical synthesis of their conflicting convergences on shared substrate domains. *Trends in Neurosciences* 22, 12-16.
- Chan,K.W., Sui,J.L., Vivaudou,M., and Logothetis,D.E. (1996). Control of channel activity through a unique amino acid residue of a G protein-gated inwardly rectifying K⁺ channel subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 14193-14198.
- Chandy,K.G., Fantino,E., Wittekindt,O., Kalman,K., Tong,L.L., Ho,T.H., Gutman,G.A., Crocq,M.A., Ganguli,R., Nimgaonkar,V., Morris-Rosendahl,D.J., and Gargus,J.J. (1998). Isolation of a novel potassium channel gene hSKCa3 containing a polymorphic CAG repeat: a candidate for schizophrenia and bipolar disorder? *Mol.Psychiatry* 3, 32-37.

- Charlier,C., Singh,N.A., Ryan,S.G., Lewis,T.B., Reus,B.E., Leach,R.J., and Leppert,M. (1998). A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family. *Nat Genet* 18, 53-55.
- Chouabe,C., Neyroud,N., Guicheney,P., Lazdunski,M., Romey,G., and Barhanin,J. (1997). Properties of KvLQT1 K⁺ channel mutations in Romano-Ward and Jervell and Lange-Nielsen inherited cardiac arrhythmias. *EMBO J* 16, 5472-5479.
- Coghlan,M.J. and Carroll,W.A. (2001). Chapter 2. Potassium channel modulators for the treatment of CNS disorders. *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, Vol 36 36, 11-20.
- Coleman,S.K., Newcombe,J., Pryke,J., and Dolly,J.O. (1999). Subunit composition of Kv1 channels in human CNS. *Journal of Neurochemistry* 73, 849-858.
- Cooper,E.C., Aldape,K.D., Abosch,A., Barbaro,N.M., Berger,M.S., Peacock,W.S., Jan,Y.N., and Jan,L.Y. (2000). Colocalization and coassembly of two human brain M-type potassium channel subunits that are mutated in epilepsy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4914-4919.
- Crouzy,S., Berneche,S., and Roux,B. (2001). Extracellular blockade of K⁺ channels by TEA: Results from molecular dynamics simulations of the KcsA channel. *Journal of General Physiology* 118, 207-217.
- Cruzblanca,H., Koh,D.S., and Hille,B. (1998). Bradykinin inhibits M current via phospholipase C and Ca²⁺ release from IP₃-sensitive Ca²⁺ stores in rat sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7151-7156.
- Dedek,K., Fusco,L., Teloy,N., and Steinlein,O.K. (2003). Neonatal convulsions and epileptic encephalopathy in an Italian family with a missense mutation in the fifth transmembrane region of KCNQ2. *Epilepsy Research* 54, 21-27.
- Dedek,K., Kunath,B., Kananura,C., Reuner,U., Jentsch,T.J., and Steinlein,O.K. (2001). Myokymia and neonatal epilepsy caused by a mutation in the voltage sensor of the KCNQ2 K⁺ channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12272-12277.
- Dedek,K. and Waldegger,S. (2001). Colocalization of KCNQ1/KCNE channel subunits in the mouse gastrointestinal tract. *Pflugers Arch.* 442, 896-902.

- del Camino,D. and Yellen,G. (2001). Tight steric closure at the intracellular activation gate of a voltage-gated $K^{(+)}$ channel. *Neuron* 32, 649-656.
- Dell'Acqua,M.L., Faux,M.C., Thorburn,J., Thorburn,A., and Scott,J.D. (1998). Membrane-targeting sequences on AKAP79 bind phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Embo Journal* 17, 2246-2260.
- Delmas,P., Wanaverbecq,N., Abogadie,F.C., Mistry,M., and Brown,D.A. (2002). Signaling microdomains define the specificity of receptor-mediated $InsP_3$ pathways in neurons. *Neuron* 34, 209-220.
- Devaux,J.J., Kleopa,K.A., Cooper,E.C., and Scherer,S.S. (2004). KCNQ2 is a nodal K^+ channel. *Journal of Neuroscience* 24, 1236-1244.
- Doyle,D.A., Morais,C.J., Pfuetzner,R.A., Kuo,A., Gulbis,J.M., Cohen,S.L., Chait,B.T., and MacKinnon,R. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K^+ conduction and selectivity. *Science* 280, 69-77.
- Ford,C.P., Stemkowski,P.L., Light,P.E., and Smith,P.A. (2003). Experiments to test the role of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in neurotransmitter-induced M-channel closure in bullfrog sympathetic neurons. *Journal of Neuroscience* 23, 4931-4941.
- Gamper,N., Li,Y., and Shapiro,M.S. (2005). Structural requirements for differential sensitivity of KCNQ K^+ channels to modulation by Ca^{2+} /calmodulin. *Molecular Biology of the Cell* 16, 3538-3551.
- Gamper,N. and Shapiro,M.S. (2003). Calmodulin mediates Ca^{2+} -dependent modulation of M-type K^+ channels. *Journal of General Physiology* 122, 17-31.
- Gloyn,A.L., Pearson,E.R., Antcliff,J.F., Proks,P., Bruining,G.J., Slingerland,A.S., Howard,N., Srinivasan,S., Silva,J.M.C.L., Molnes,J., Edghill,E.L., Frayling,T.M., Temple,I.K., Mackay,D., Shield,J.P.H., Sumnik,Z., van Rhijn,A., Wales,J.K.H., Clark,P., Gorman,S., Aisenberg,J., Ellard,S., Njolstad,P.R., Ashcroft,F.M., and Hattersley,A.T. (2004). Activating mutations in the gene encoding the ATP-sensitive potassium-channel subunit Kir6.2 and permanent neonatal diabetes. *New England Journal of Medicine* 350, 1838-1849.

Greger,I.H., Khatri,L., Kong,X.P., and Ziff,E.B. (2003). AMPA receptor tetramerization is mediated by Q/R editing. *Neuron* 40, 763-774.

Gulbis,J.M., Zhou,M., Mann,S., and MacKinnon,R. (2000). Structure of the cytoplasmic beta subunit-T1 assembly of voltage-dependent K⁺ channels. *Science* 289, 123-127.

Gutman,G.A., Chandy,K.G., Adelman,J.P., Aiyar,J., Bayliss,D.A., Clapham,D.E., Covarrubias,M., Desir,G.V., Furuichi,K., Ganetzky,B., Garcia,M.L., Grissmer,S., Jan,L.Y., Karschin,A., Kim,D., Kuperschmidt,S., Kurachi,Y., Lazdunski,M., Lesage,F., Lester,H.A., McKinnon,D., Nichols,C.G., O'Kelly,I., Robbins,J., Robertson,G.A., Rudy,B., Sanguinetti,M., Seino,S., Stuehmer,W., Tamkun,M.M., Vandenberg,C.A., Wei,A., Wulff,H., and Wymore,R.S. (2003). International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: Potassium channels. *Pharmacological Reviews* 55, 583-586.

Hadley,J.K., Noda,M., Selyanko,A.A., Wood,I.C., Abogadie,F.C., and Brown,D.A. (2000). Differential tetraethylammonium sensitivity of KCNQ1-4 potassium channels. *Br J Pharmacol* 129, 413-415.

Hadley,J.K., Passmore,G.G., Tatulian,L., Al-Qatari,M., Ye,F., Wickenden,A.D., and Brown,D.A. (2003). Stoichiometry of expressed KCNQ2/KCNQ3 channels and subunit composition of native ganglionic M-currents deduced from block by tetraethylammonium (TEA). *J Neurosci*.

Hardt,B. and Bause,E. (2002). Lysine can be replaced by histidine but not by arginine as the ER retrieval motif for type I membrane proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 291, 751-757.

Hoshi,N., Zhang,J.S., Omaki,M., Takeuchi,T., Yokoyama,S., Wanaverbecq,N., Langeberg,L.K., Yoneda,Y., Scott,J.D., Brown,D.A., and Higashida,H. (2003). AKAP150 signaling complex promotes suppression of the M-current by muscarinic agonists. *Nature Neuroscience* 6, 564-571.

Hugnot,J.P., Salinas,M., Lesage,F., Guillemare,E., deWeille,J., Heurteaux,C., Mattei,M.G., and Lazdunski,M. (1996). Kv8.1, a new neuronal potassium channel subunit with specific inhibitory properties towards Shab and Shaw channels. *Embo Journal* 15, 3322-3331.

- Inagaki,N., Gono,T., Clement,J.P., Namba,N., Inazawa,J., Gonzalez,G., Aguilarbryan,L., Seino,S., and Bryan,J. (1995). Reconstitution of I-Katp - An Inward Rectifier Subunit Plus the Sulfonylurea Receptor. *Science* 270, 1166-1170.
- Isom,L.L., De Jongh,K.S., and Catterall,W.A. (1994). Auxiliary subunits of voltage-gated ion channels. *Neuron* 12, 1183-1194.
- Jegla,T. and Salkoff,L. (1997). A novel subunit for Shal K⁺ channels radically alters activation and inactivation. *Journal of Neuroscience* 17, 32-44.
- Jensen,H.S., Callo,K., Jespersen,T., Jensen,B.S., and Olesen,S.P. (2005). The KCNQ5 potassium channel from mouse: A broadly expressed M-current like potassium channel modulated by zinc, pH, and volume changes. *Molecular Brain Research* 139, 52-62.
- Jentsch,T.J. (2000). Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease. *Nat Rev Neurosci* 1, 21-30.
- Jiang,Y., Lee,A., Chen,J., Cadene,M., Chait,B.T., and MacKinnon,R. (2002). The open pore conformation of potassium channels. *Nature* 417, 523-526.
- Jiang,Y.X., Lee,A., Chen,J.Y., Ruta,V., Cadene,M., Chait,B.T., and MacKinnon,R. (2003). X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* 423, 33-41.
- Johnson,J.P.J. and Zagotta,W.N. (2001). Rotational movement during cyclic nucleotide-gated channel opening. *Nature* 412, 917-921.
- Joiner,W.J., Khanna,R., Schlichter,L.C., and Kaczmarek,L.K. (2001). Calmodulin regulates assembly and trafficking of SK4/IK1 Ca²⁺-activated K⁺ channels. *J Biol Chem* 31, 699-711.
- Kavran,J.M., Klein,D.E., Lee,A., Falasca,M., Isakoff,S.J., Skolnik,E.Y., and Lemmon,M.A. (1998). Specificity and promiscuity in phosphoinositide binding by Pleckstrin homology domains. *Journal of Biological Chemistry* 273, 30497-30508.
- Kennedy,M.E., Nemec,J., Corey,S., Wickman,K., and Clapham,D.E. (1999). GIRK4 confers appropriate processing and cell surface localization to G-protein-gated potassium channels. *J Biol Chem* 274, 2571-2582.
- Kharkovets,T., Hardelin,J.P., Safieddine,S., Schweizer,M., El-Amraoui,A., Petit,C., and Jentsch,T.J. (2000). KCNQ4, a K⁺ channel mutated in a form of dominant deafness, is

expressed in the inner ear and the central auditory pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4333-4338.

Kobrinisky,E., Mirshahi,T., Zhang,H., Jin,T., and Logothetis,D.E. (2000). Receptor-mediated hydrolysis of plasma membrane messenger PIP_2 leads to K^+ -current desensitization. *Nat.Cell Biol.* 2, 507-514.

Kubisch,C., Schroeder,B.C., Friedrich,T., Lutjohann,B., El-Amraoui,A., Marlin,S., Petit,C., and Jentsch,T.J. (1999). KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell* 96, 437-446.

Lamas,J.A., Selyanko,A.A., and Brown,D.A. (1997). Effects of a cognition-enhancer, linopirdine (DuP 996), on M-type potassium currents (IK_M) and some other voltage- and ligand-gated membrane currents in rat sympathetic neurons. *Eur J Neurosci* 9, 605-616.

Leppert,M., Anderson,V.E., Quattlebaum,T., Stauffer,D., O'Connell,P., Nakamura,Y., Lalouel,J.M., and White,R. (1989). Benign familial neonatal convulsions linked to genetic markers on chromosome 20. *Nature* 337, 647-648.

Lerche,C., Scherer,C.R., Seebohm,G., Derst,C., Wei,A.D., Busch,A.E., and Steinmeyer,K. (2000). Molecular cloning and functional expression of KCNQ5, a potassium channel subunit that may contribute to neuronal M-current diversity. *J Biol Chem* 275, 22395-22400.

Lerche,H., Biervert,C., Alekov,A.K., Schleithoff,L., Lindner,M., Klinger,W., Bretschneider,F., Mitrovic,N., Jurkat-Rott,K., Bode,H., Lehmann-Horn,F., and Steinlein,O.K. (1999). A reduced K^+ current due to a novel mutation in KCNQ2 causes neonatal convulsions. *Ann.Neurol.* 46, 305-312.

Lerche,H., Jurkat-Rott,K., and Lehmann-Horn,F. (2001). Ion channels and epilepsy. *Am.J.Med.Genet.* 106, 146-159.

Letourneur,F., Hennecke,S., Demolliere,C., and Cosson,P. (1995). Steric Masking of A Dilysine Endoplasmic-Reticulum Retention Motif During Assembly of the Human High-Affinity Receptor for Immunoglobulin-e. *Journal of Cell Biology* 129, 971-978.

- Lewis,T.B., Leach,R.J., Ward,K., O'Connell,P., and Ryan,S.G. (1993). Genetic heterogeneity in benign familial neonatal convulsions: identification of a new locus on chromosome 8q. *Am.J.Hum.Genet.* *53*, 670-675.
- Li,M., Jan,Y.N., and Jan,L.Y. (1992). Specification of subunit assembly by the hydrophilic amino-terminal domain of the Shaker potassium channel. *Science* *257*, 1225-1230.
- Li,Y., Gamper,N., Hilgemann,D.W., and Shapiro,M.S. (2005). Regulation of Kv7 (KCNQ) K⁺ channel open probability by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Journal of Neuroscience* *25*, 9825-9835.
- Li,Y., Gamper,N., and Shapiro,M.S. (2004). Single-channel analysis of KCNQ K⁺ channels reveals the mechanism of augmentation by a cysteine-modifying reagent. *Journal of Neuroscience* *24*, 5079-5090.
- Liou,H.H., Zhou,S.S., and Huang,C.L. (1999). Regulation of ROMK1 channel by protein kinase A via a phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *96*, 5820-5825.
- Long,S.B., Campbell,E.B., and MacKinnon,R. (2005). Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science* *309*, 897-903.
- Lopes,C.M., Zhang,H., Rohacs,T., Jin,T., Yang,J., and Logothetis,D.E. (2002). Alterations in conserved Kir channel-PIP₂ interactions underlie channelopathies. *Neuron* *34*, 933-944.
- Loussouarn,G. and Escande,D. (2003). Functional KCNQ1/KCNE1 channel complex requires both intracellular PIP₂ and MgATP. *Biophysical Journal* *84*, 548A.
- Loussouarn,G., Park,K.H., Bellocq,C., Baro,I., Charpentier,F., and Escande,D. (2003). Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, PIP₂, controls KCNQ1/KCNE1 voltage-gated potassium channels: a functional homology between voltage-gated and inward rectifier K⁺ channels. *Embo Journal* *22*, 5412-5421.
- Ma,D. and Jan,L.Y. (2002). ER transport signals and trafficking of potassium channels and receptors. *Curr.Opin.Neurobiol.* *12*, 287-292.

- Main, M.J., Cryan, J.E., Dupere, J.R., Cox, B., Clare, J.J., and Burbidge, S.A. (2000). Modulation of KCNQ2/3 potassium channels by the novel anticonvulsant retigabine. *Mol Pharmacol* 58, 253-262.
- Manganas, L.N. and Trimmer, J.S. (2000). Subunit composition determines Kv1 potassium channel surface expression. *J Biol Chem* 275, 29685-29693.
- Manganas, L.N., Wang, Q., Scannevin, R.H., Antonucci, D.E., Rhodes, K.J., and Trimmer, J.S. (2001). Identification of a trafficking determinant localized to the Kv1 potassium channel pore. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 98, 14055-14059.
- Margeta-Mitrovic, M., Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (2000). A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. *Neuron* 27, 97-106.
- Marrion, N.V. (1997). Control of M-current. *Annu Rev Physiol* 59, 483-504.
- Martire, M., Castaldo, P., D'Amico, M., Preziosi, P., Annunziato, L., and Tagliatela, M. (2004). M channels containing KCNQ2 subunits modulate norepinephrine, aspartate, and GABA release from hippocampal nerve terminals. *Journal of Neuroscience* 24, 592-597.
- Marx, S.O., Kurokawa, J., Reiken, S., Motoike, H., D'Armiento, J., Marks, A.R., and Kass, R.S. (2002). Requirement of a macromolecular signaling complex for β -adrenergic receptor modulation of the KCNQ1-KCNE1 potassium channel. *Science* 295, 496-499.
- Miraglia, d.G., Coppola, G., Scuccimarra, G., Cirillo, G., Bellini, G., and Pascotto, A. (2000). Benign familial neonatal convulsions (BFNC) resulting from mutation of the KCNQ2 voltage sensor. *Eur. J. Hum. Genet.* 8, 994-997.
- Mitcheson, J.S., Chen, J., Lin, M., Culberson, C., and Sanguinetti, M.C. (2000). A structural basis for drug-induced long QT syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 12329-12333.
- Morais-Cabral, J.H., Zhou, Y., and MacKinnon, R. (2001). Energetic optimization of ion conduction rate by the K⁺ selectivity filter. *Nature* 414, 37-42.
- Mori, K., Yano, I., and Hashimoto, T. (1993). Infantile Spasms in One Member of A Family with Benign Familial Neonatal Convulsions. *Epilepsia* 34, 621-626.

- Moulard,B., Picard,F., le Hellard,S., Agulhon,C., Weiland,S., Favre,I., Bertrand,S., Malafosse,A., and Bertrand,D. (2001). Ion channel variation causes epilepsies. *Brain Res.Brain Res.Rev.* *36*, 275-284.
- Nakajo,K. and Kubo,Y. (2005). Protein kinase C shifts the voltage dependence of KCNQ/M channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Journal of Physiology-London* *569*, 59-74.
- Nilsson,J., Madeja,M., and Arhem,P. (2003). Local anesthetic block of Kv channels: Role of the S6 helix and the S5-S6 linker for bupivacaine action. *Molecular Pharmacology* *63*, 1417-1429.
- Nouvian,R., Ruel,J., Wang,J., Guitton,M.J., Pujol,R., and Puel,J.L. (2003). Degeneration of sensory outer hair cells following pharmacological blockade of cochlear KCNQ channels in the adult guinea pig. *European Journal of Neuroscience* *17*, 2553-2562.
- Nufer,O. and Hauri,H.P. (2003). ER export: Call 14-3-3. *Current Biology* *13*, R391-R393.
- O'Kelly,I., Butler,M.H., Zilberberg,N., and Goldstein,S.A. (2002). Forward transport. 14-3-3 binding overcomes retention in endoplasmic reticulum by dibasic signals. *Cell* *111*, 577-588.
- Okada,M., Zhu,G., Hirose,S., Ito,K.I., Murakami,T., Wakui,M., and Kaneko,S. (2003). Age-dependent modulation of hippocampal excitability by KCNQ-channels. *Epilepsy Res.* *53*, 81-94.
- Orio,P., Rojas,P., Ferreira,G., and Latorre,R. (2002). New disguises for an old channel: MaxiK channel beta-subunits. *News in Physiological Sciences* *17*, 156-161.
- Ottschytch,N., Raes,A.L., Timmermans,J.P., and Snyders,D.J. (2005). Domain analysis of Kv6.3, an electrically silent channel. *Journal of Physiology-London* *568*, 737-747.
- Ottschytch,N., Raes,A.L., Van Hoorick,D., and Snyders,D.J. (2002). Obligatory heterotetramerization of novel Kv channel subunits promotes trafficking out of the ER. *Biophysical Journal* *82*, 254A.
- Pan,Z.M., Kao,T.C., Horvath,Z., Lemos,J., Sul,J.Y., Cranstoun,S.D., Bennett,V., Scherer,S.S., and Cooper,E.C. (2006). A common ankyrin-G-based mechanism retains

- KCNQ and Na-V channels at electrically active domains of the axon. *Journal of Neuroscience* 26, 2599-2613.
- Patel,A.J., Lazdunski,M., and Honore,E. (1997). Kv2.1/Kv9.3, a novel ATP-dependent delayed-rectifier K⁺ channel in oxygen-sensitive pulmonary artery myocytes. *Embo Journal* 16, 6615-6625.
- Pongs,O., Leicher,T., Berger,M., Roeper,J., Bähring,R., Wray,D., Giese,K.P., Silva,A.J., and Storm,J.F. (1999). Functional and molecular aspects of voltage-gated K⁺ channel beta subunits. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 868, 344-355.
- Prole,D.L. and Marrion,N.V. (2004). Ionic permeation and conduction properties of neuronal KCNQ2/KCNQ3 potassium channels. *Biophysical Journal* 86, 1454-1469.
- Ptacek,L.J., George,A.L., Jr., Griggs,R.C., Tawil,R., Kallen,R.G., Barchi,R.L., Robertson,M., and Leppert,M.F. (1991). Identification of a mutation in the gene causing hyperkalemic periodic paralysis. *Cell* 67, 1021-1027.
- Richards,M.C., Heron,S.E., Spendlove,H.E., Scheffer,I.E., Grinton,B., Berkovic,S.F., Mulley,J.C., and Davy,A. (2004). Novel mutations in the KCNQ2 gene link epilepsy to a dysfunction of the KCNQ2-calmodulin interaction. *Journal of Medical Genetics* 41.
- Ridley,R.M., Murray,T.K., Johnson,J.A., and Baker,H.F. (1986). Learning Impairment Following Lesion of the Basal Nucleus of Meynert in the Marmoset - Modification by Cholinergic Drugs. *Brain Research* 376, 108-116.
- Robbins,J. (2001). KCNQ potassium channels: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Ther* 90, 1-19.
- Rogawski,M.A. (2000). KCNQ2/KCNQ3 K⁺ channels and the molecular pathogenesis of epilepsy: implications for therapy. *Trends Neurosci* 23, 393-398.
- Romey,G., Attali,B., Chouabe,C., Abitbol,I., Guillemare,E., Barhanin,J., and Lazdunski,M. (1997). Molecular mechanism and functional significance of the MinK control of the KvLQT1 channel activity. *J Biol Chem* 272, 16713-16716.

- Ronen,G.M., Rosales,T.O., Connolly,M., Anderson,V.E., and Leppert,M. (1993). Seizure Characteristics in Chromosome 20 Benign Familial Neonatal Convulsions. *Neurology* 43, 1355-1360.
- Saganich,M.J., Machado,E., and Rudy,B. (2001). Differential expression of genes encoding subthreshold-operating voltage-gated K⁺ channels in brain. *J Neurosci* 21, 4609-4624.
- Salinas,M., deWeille,J., Guillemare,E., Lazdunski,M., and Hugnot,J.P. (1997). Modes of regulation of Shab K⁺ channel activity by the Kv8.1 subunit. *Journal of Biological Chemistry* 272, 8774-8780.
- Sanguinetti,M.C., Curran,M.E., Zou,A., Shen,J., Spector,P.S., Atkinson,D.L., and Keating,M.T. (1996). Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel. *Nature* 384, 80-83.
- Schmitt,N., Schwarz,M., Peretz,A., Abitbol,I., Attali,B., and Pongs,O. (2000). A recessive C-terminal Jervell and Lange-Nielsen mutation of the KCNQ1 channel impairs subunit assembly. *EMBO J* 19, 332-340.
- Schroeder,B.C., Hechenberger,M., Weinreich,F., Kubisch,C., and Jentsch,T.J. (2000). KCNQ5, a novel potassium channel broadly expressed in brain, mediates M-type currents. *J Biol Chem* 275, 24089-24095.
- Schroeder,B.C., Kubisch,C., Stein,V., and Jentsch,T.J. (1998). Moderate loss of function of cyclic-AMP-modulated KCNQ2/KCNQ3 K⁺ channels causes epilepsy. *Nature* 396, 687-690.
- Schwake,M., Jentsch,T.J., and Friedrich,T. (2003). A carboxy-terminal domain determines the subunit specificity of KCNQ K⁺ channel assembly. *EMBO Rep.* 4, 76-81.
- Schwake,M., Pusch,M., Kharkovets,T., and Jentsch,T.J. (2000). Surface expression and single channel properties of KCNQ2/KCNQ3, M-type K⁺ channels involved in epilepsy. *J Biol Chem* 275, 13343-13348.
- Scott,D.B., Blanpied,T.A., Swanson,G.T., Zhang,C., and Ehlers,M.D. (2001). An NMDA receptor ER retention signal regulated by phosphorylation and alternative splicing. *J Neurosci* 21, 3063-3072.

Seeböhm,G., Lerche,C., Pusch,M., Steinmeyer,K., Bruggemann,A., and Busch,A.E. (2001a). A kinetic study on the stereospecific inhibition of KCNQ1 and I_{Ks} by the chromanol 293B. *Br.J.Pharmacol.* 134, 1647-1654.

Seeböhm,G., Scherer,C.R., Busch,A.E., and Lerche,C. (2001b). Identification of specific pore residues mediating KCNQ1 inactivation. A novel mechanism for long QT syndrome. *J.Biol.Chem.* 276, 13600-13605.

Selyanko,A.A., Delmas,P., Hadley,J.K., Tatulian,L., Wood,I.C., Mistry,M., London,B., and Brown,D.A. (2002). Dominant-negative subunits reveal potassium channel families that contribute to M-like potassium currents. *J.Neurosci.* 22, RC212.

Selyanko,A.A., Hadley,J.K., and Brown,D.A. (2001). Properties of single M-type KCNQ2/KCNQ3 potassium channels expressed in mammalian cells. *J Physiol* 534, 15-24.

Shah,M.M., Mistry,M., Marsh,S.J., Brown,D.A., and Delmas,P. (2002). Molecular correlates of the M-current in cultured rat hippocampal neurons. *J.Physiol* 544, 29-37.

Shahidullah,M., Santarelli,L.C., Wen,H., and Levitan,I.B. (2005). Expression of a calmodulin-binding KCNQ2 potassium channel fragment modulates neuronal M-current and membrane excitability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 16454-16459.

Shapiro,M.S., Roche,J.P., Kaftan,E.J., Cruzblanca,H., Mackie,K., and Hille,B. (2000). Reconstitution of muscarinic modulation of the KCNQ2/KCNQ3 K^+ channels that underlie the neuronal M current. *J Neurosci* 20, 1710-1721.

Shen,W.X., Hamilton,S.E., Nathanson,N.M., and Surmeier,D.J. (2005). Cholinergic suppression of KCNQ channel currents enhances excitability of striatal medium spiny neurons. *Journal of Neuroscience* 25, 7449-7458.

Shi,G.Y., Nakahira,K., Hammond,S., Rhodes,K.J., Schechter,L.E., and Trimmer,J.S. (1996). beta Subunits promote K^+ channel surface expression through effects early in biosynthesis. *Neuron* 16, 843-852.

Shibata,R., Misonou,H., Campomanes,C.R., Anderson,A.E., Schrader,L.A., Doliveira,L.C., Carroll,K.I., Sweatt,J.D., Rhodes,K.J., and Trimmer,J.S. (2003). A fundamental role for

- KChIPs in determining the molecular properties and trafficking of Kv4.2 potassium channels. *Journal of Biological Chemistry* 278, 36445-36454.
- Sims,S.M., Singer,J.J., and Walsh,J.V.J. (1988). Antagonistic adrenergic-muscarinic regulation of M current in smooth muscle cells. *Science* 239, 190-193.
- Singh,N.A., Charlier,C., Stauffer,D., DuPont,B.R., Leach,R.J., Melis,R., Ronen,G.M., Bjerre,I., Quattlebaum,T., Murphy,J.V., McHarg,M.L., Gagnon,D., Rosales,T.O., Peiffer,A., Anderson,V.E., and Leppert,M. (1998). A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nat Genet* 18, 25-29.
- Singh,N.A., Westenskow,P., Charlier,C., Pappas,C., Leslie,J., Dillon,J., Anderson,V.E., Sanguinetti,M.C., and Leppert,M.F. (2003). KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel genes in benign familial neonatal convulsions: expansion of the functional and mutation spectrum. *Brain* 126, 2726-2737.
- Standley,S., Roche,K.W., McCallum,J., Sans,N., and Wenthold,R.J. (2000). PDZ domain suppression of an ER retention signal in NMDA receptor NR1 splice variants. *Neuron* 28, 887-898.
- Steinlein,O., Schuster,V., Fischer,C., and Haussler,M. (1995). Benign familial neonatal convulsions: confirmation of genetic heterogeneity and further evidence for a second locus on chromosome 8q. *Hum.Genet.* 95, 411-415.
- Stocker,M., Hellwig,M., and Kerschensteiner,D. (1999). Subunit assembly and domain analysis of electrically silent K⁺ channel alpha-subunits of the rat Kv9 subfamily. *J Neurochem* 72, 1725-1734.
- Suh,B.C. and Hille,B. (2002). Recovery from muscarinic modulation of M current channels requires phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis. *Neuron* 35, 507-520.
- Suh,B.C., Horowitz,L.F., Hirdes,W., Mackie,K., and Hille,B. (2004). Regulation of KCNQ2/KCNQ3 current by G protein cycling: The kinetics of receptor-mediated signaling by G(q). *Journal of General Physiology* 123, 663-683.
- Takumi,T., Ohkubo,H., and Nakanishi,S. (1988). Cloning of A Membrane-Protein That Induces A Slow Voltage-Gated Potassium Current. *Science* 242, 1042-1045.

- Tatulian,L. and Brown,D.A. (2003). Effect of the KCNQ potassium channel opener retigabine on single KCNQ2/3 channels expressed in CHO cells. *Journal of Physiology-London* 549, 57-63.
- Thomas,P.M., Cote,G.J., Wohlk,N., Haddad,B., Mathew,P.M., Rabl,W., Aguilarbryan,L., Gagel,R.F., and Bryan,J. (1995). Mutations in the Sulfonylurea Receptor Gene in Familial Persistent Hyperinsulinemic Hypoglycemia of Infancy. *Science* 268, 426-429.
- Tinel,N., Lauritzen,I., Chouabe,C., Lazdunski,M., and Borsotto,M. (1998). The KCNQ2 potassium channel: splice variants, functional and developmental expression. *Brain localization and comparison with KCNQ3. FEBS Lett* 438, 171-176.
- Tu,L. and Deutsch,C. (1999). Evidence for dimerization of dimers in K⁺ channel assembly. *Biophys J* 76, 2004-2017.
- Villarreal,A. (1996). M-current suppression in PC12 cells by bradykinin is mediated by a pertussis toxin-insensitive G-protein and modulated by intracellular calcium. *Brain Res* 740, 227-233.
- Wang,H.S., Pan,Z., Shi,W., Brown,B.S., Wymore,R.S., Cohen,I.S., Dixon,J.E., and McKinnon,D. (1998). KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: molecular correlates of the M-channel. *Science* 282, 1890-1893.
- Wang,Q., Curran,M.E., Splawski,I., Burn,T.C., Millholland,J.M., VanRaay,T.J., Shen,J., Timothy,K.W., Vincent,G.M., deJager,T., Schwartz,P.J., Towbin,J.A., Moss,A.J., Atkinson,D.L., Landes,G.M., Connors,T.D., and Keating,M.T. (1996). Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nature Genetics* 12, 17-23.
- Wen,H. and Levitan,I.B. (2002). Calmodulin is an auxiliary subunit of KCNQ2/3 potassium channels. *J.Neurosci.* 22, 7991-8001.
- Wickenden,A.D. (2002). Potassium channels as anti-epileptic drug targets. *Neuropharmacology* 43, 1055-1060.
- Wu,Y.J. and Dworetzky,S.I. (2005). Recent developments on KCNQ potassium channel openers. *Current Medicinal Chemistry* 12, 453-460.

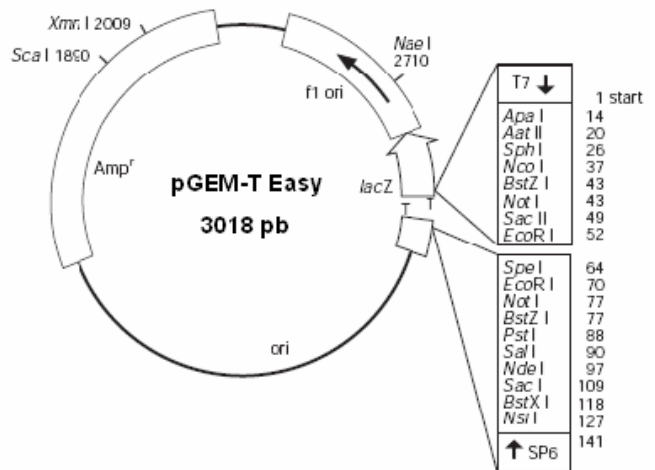
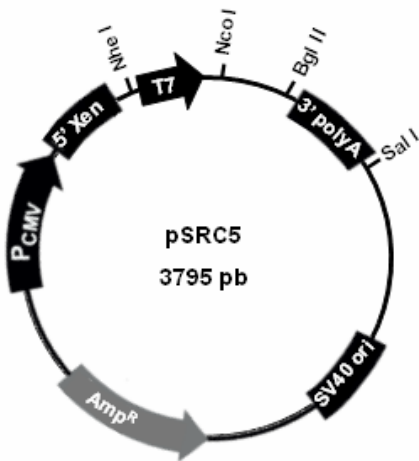
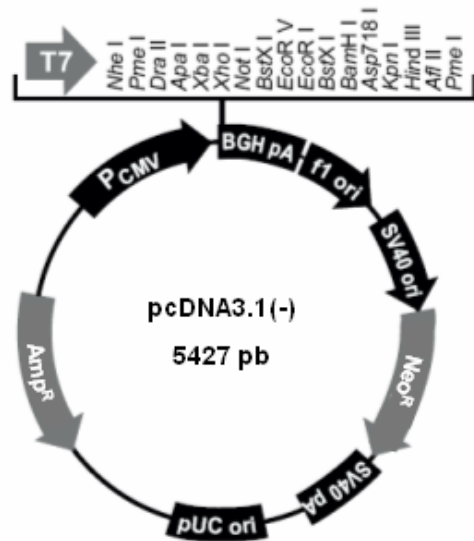
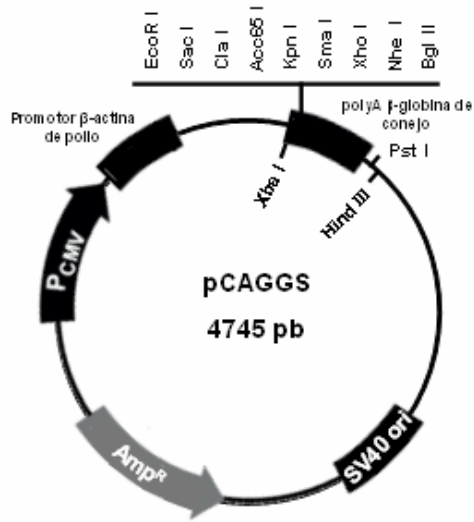
- Yang,W.P., Levesque,P.C., Little,W.A., Conder,M.L., Ramakrishnan,P., Neubauer,M.G., and Blanaar,M.A. (1998). Functional expression of two KvLQT1-related potassium channels responsible for an inherited idiopathic epilepsy. *J.Biol.Chem.* 273, 19419-19423.
- Yellen,G., Jurman,M.E., Abramson,T., and MacKinnon,R. (1991). Mutations affecting internal TEA blockade identify the probable pore-forming region of a K⁺ channel. *Science* 251, 939-942.
- Yuan,H.B., Michelsen,K., and Schwappach,B. (2003). 14-3-3 dimers probe the assembly status of multimeric membrane proteins. *Current Biology* 13, 638-646.
- Yus-Nájera,E., Santana-Castro,I., and Villarroel,A. (2002). The identification and characterization of a noncontinuous calmodulin-binding site in noninactivating voltage-dependent KCNQ potassium channels. *J.Biol.Chem.* 277, 28545-28553.
- Zerangue,N., Schwappach,B., Jan,Y.N., and Jan,L.Y. (1999). A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels. *Neuron* 22, 537-548.
- Zhang,H.L., Craciun,L.C., Mirshahi,T., Rohacs,T., Lopes,C.M.B., Jin,T.H., and Logothetis,D.E. (2003). PIP₂ activates KCNQ channels, and its hydrolysis underlies receptor-mediated inhibition of M currents. *Neuron* 37, 963-975.
- Zhang,M., Jiang,M., and Tseng,G.N. (2001). MinK-related peptide 1 associates with Kv4.2 and modulates its gating function - Potential role as beta subunit of cardiac transient outward channel? *Circulation Research* 88, 1012-1019.
- Zhou,H., Chepilko,S., Schutt,W., Choe,H., Palmer,L.G., and Sackin,H. (1996). Mutations in the pore region of ROMK enhance Ba²⁺ block. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 40, C1949-C1956.
- Zhou,M., Morais-Cabral,J.H., Mann,S., and MacKinnon,R. (2001). Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. *Nature* 411, 657-661.
- Zhu,J., Gomez,B., Watanabe,I., and Thornhill,W.B. (2005). Amino acids in the pore region of Kv1 potassium channels dictate cell-surface protein levels: a possible trafficking code in the Kv1 subfamily. *Biochemical Journal* 388, 355-362.

Zhu,J., Watanabe,I., Gomez,B., and Thornhill,W.B. (2001). Determinants involved in Kv1 potassium channel folding in the endoplasmic reticulum, glycosylation in the Golgi, and cell surface expression. *Journal of Biological Chemistry* 276, 39419-39427.

Mutaciones en KCNQ2 que producen BFNC		
Mutaciones puntuales		
A196V	S4	Moulard et al., 2001
L197P	S4	Moulard et al., 2001
R207W	S4	Dedek et al., 2001
M208V	S4	Singh et al., 2003
R214W	S4	Miraglia et al., 2000
H228Q	Lazo 4	Singh et al., 2003
L243F	S5	Singh et al., 2003
S247W	S5	Dedek et al., 2003
V250G	S5	Moulard et al., 2001
Y284C	poro	Singh et al., 1998
A306T	S6	Singh et al., 1998
R333Q	C-terminal	Singh et al., 2003
R333W	C-terminal	Schmitt et al., 2005
L339R	C-terminal	Moular et al., 2001
R353G	C-terminal	Richards et al., 2004
K526N	C-terminal	Borgatti et al., 2004
R553Q	C-terminal	Moular et al., 2001
L609R	C-terminal	Richards et al., 2004
Cambios de pauta de lectura		
K69	N-terminal	Richards et al., 2004
L129	S2	Singh et al., 2003
R153	Lazo 2	Moulard et al., 2001
K283	Poro	Singh et al., 1998
E382	C-terminal	Singh et al., 1998
K388	C-terminal	Pereira et al., 2004
P405	C-terminal	Lee et al., 2000
S494	C-terminal	Singh et al., 1998
Y534	C-terminal	Biervert et al., 1998
Y616	C-terminal	Biervert et al., 1999
S644	C-terminal	Tang et al., 2003
P681	C-terminal	Coppola et al., 2003
G838	C-terminal	Lerche et al., 1999

Cambios de sitios de ajuste		
R397	C-terminal	Lee et al., 2000
E481	C-terminal	Richards et al., 2004
C516	C-terminal	Singh et al., 1998
R560	C-terminal	Richards et al., 2004
Truncaciones		
M1V	Codón inicial	Richards et al., 2004
M1T	Codón inicial	Richards et al., 2004
E254X	poro	Bassi et al., 2005
W269X	poro	Singh et al., 2003
Q323X	C-terminal	Singh et al., 2003
R420X	C-terminal	Richards et al., 2004
R448X	C-terminal	Moulard et al., 2001
Mutaciones en KCNQ3 que producen BFNC		
Mutaciones puntuales		
D305G	poro	Singh et al., 2003
W309R	poro	Hirose et al., 2000
G310V	poro	Charlier et al., 1998

VECTORES



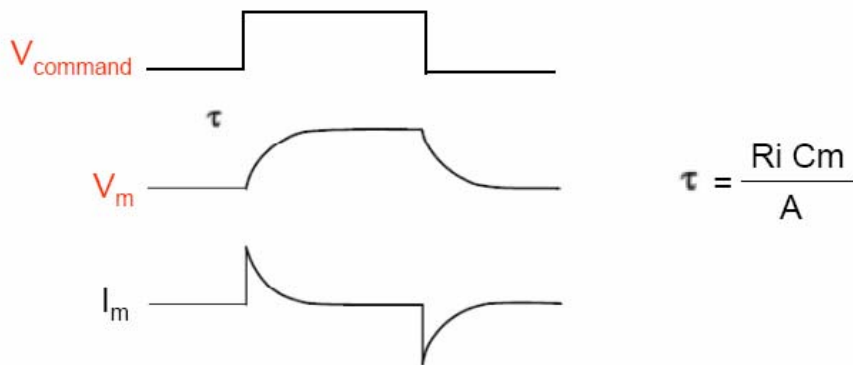
REGISTROS DE DOBLE ELECTRODO

Una de las leyes más importante de la electricidad es la **ley de Ohm**:

$$\Delta V = I \cdot R$$

donde ΔV es la diferencia de voltaje aplicada, I la intensidad de corriente y R la resistencia.

Al aplicar un pulso de voltaje se inyecta la corriente necesaria para conseguir el voltaje fijado. Si la resistencia de la membrana es constante, no hay canales que se abren o se cierran, la corriente necesaria será también constante. Pero si el pulso de voltaje provoca la apertura de canales, la resistencia de la membrana baja y la corriente aumentará en proporción. Al aplicar un cambio de voltaje la membrana se produce un artefacto, el **capacitivo**. La capacitancia de la membrana es la habilidad de guardar carga cuando se produce un cambio de voltaje. Al aplicar una corriente ésta primero satisface los requerimientos de carga del condensador de la membrana y después cambia el voltaje de la membrana. Por lo tanto después de un pulso de voltaje, hasta que la membrana no se carga la corriente no fluye a través de la célula y el voltaje deseado tarda un tiempo en alcanzarse, ése tiempo de respuesta (τ) es,



donde R_i es la resistencia del electrodo que pasa la corriente, C_m la capacitancia de la membrana y A es la ganancia comandada del amplificador.

La capacitancia aumenta con el tamaño de la membrana, en consecuencia las células grandes como los ovocitos de *Xenopus* tienen una fase de carga larga. Para conseguir alcanzar el voltaje deseado más rápido y menos errores en la fijación del voltaje se aumenta la ganancia y se baja la resistencia lo que se pueda. Exceptuando el periodo capacitivo la corriente es proporcional a la conductancia de la membrana, es decir al número de canales abiertos.

Electrodos

Los electrodos de registro consisten en capilares de vidrio que penetran el ovocito con un hilo de plata clorurado en su interior conectado al amplificador. Los electrodos convierten la corriente iónica en solución en corriente de electrones. El electrodo de cloruro de plata (Ag/AgCl) es reversible, si la corriente debe fluir a la solución el cloruro de plata se disocia, y el Cl⁻ entra en la solución si debe ir en la dirección opuesta, los iones Cl⁻ reaccionan con Ag⁺ para producir AgCl insoluble. Los electrodos por tanto deben estar sumergidos en una solución con cloro (KCl 3 M).

Los electrodos se fabricaron a partir de un capilar de vidrio de borosilicato de 1.5 mm de diámetro externo y 0.86 mm de diámetro interno (Sutter Instruments). Estos capilares, presentan un filamento de fibra de vidrio adherido a la pared interna cuya función es facilitar el llenado de los electrodos y reducir la formación de burbujas de aire. El capilar se estiró en un estirador de vidrio horizontal (P97, Sutter instruments) que permite determinar el diámetro de la punta del electrodo de vidrio (su resistencia). El tamaño de la pipeta refleja un compromiso entre prevenir el escape del líquido y la resistencia.

Errores

El potencial de membrana conseguido después de un pulso de voltaje depende de la ganancia y la resistencia de la pipeta de corriente. El error es menor cuando la ganancia sube y la resistencia baja.

La resistencia de las pipetas debe ser la menor posible (aunque cuanto menor sea más daño haremos al ovocito). Una menor resistencia del electrodo de voltaje introducirá menos ruido, pero más importante es el de corriente que cuanto mayor sea la resistencia introducirá error y más se desviará el potencial de membrana del voltaje fijado.

Al hacer registros en ovocitos es importante que el amplificador tenga un circuito de tierra virtual que elimine los errores del potencial del baño. La solución del baño se lleva a tierra mediante un electrodo sólido de tierra y las medidas de potencial se hacen relativas a tierra, con la asunción de que el baño está también a tierra. Cuando la corriente a través de la membrana es grande (en el orden de μA), se produce una caída del voltaje a través de la resistencia del electrodo de tierra. Con 5 μA de corriente y una resistencia del electrodo de tierra de 2 k Ω se produce un error de 10 mV y dependiendo de las circunstancias puede ser aun mayor. Para eliminar este error se controla el potencial del baño cerca de la superficie de la célula, esto se consigue entre otros métodos mediante un circuito de tierra

virtual de dos electrodos. Un electrodo mide el voltaje del baño cerca de la superficie del ovocito y se conecta al circuito mediante un puente de agar. El otro electrodo (IBath) se coloca en el baño y lleva la corriente. Se mide el voltaje y se lleva a tierra mediante retroalimentación negativa.

Filtro

Un filtro es un circuito que elimina las frecuencias seleccionadas de la señal. Se utiliza para eliminar las señales que no interesan y para eliminar el ruido. El filtro es la frecuencia más alta de información biológica de interés presente en la señal registrada. El teorema de Nyquist dice que para que la representación digital del registro reproduzca fielmente la señal analógica la frecuencia de muestreo (“*sampling*”) debe ser dos veces mayor que el filtro utilizado. Si la frecuencia de adquisición no es la adecuada se introducen dos errores. Uno es que la información de alta frecuencia se pierde y, la menos obvia es la introducción del “aliasing”. El aliasing ocurre cuando una señal se muestrea demasiado despacio (por debajo que la frecuencia de Nyquist) y se obtiene una amplitud errónea.

Three Mechanisms Underlie KCNQ2/3 Heteromeric Potassium M-Channel Potentiation

Ainhoa Etxeberria,¹ Irene Santana-Castro,¹ M. Paz Regalado,¹ Paloma Aivar,² and Alvaro Villarroel²

¹Instituto Cajal Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), 28002 Madrid, Spain, and ²Unidad de Biofísica, CSIC-Universidad del País Vasco (UPV)/Euskal Herriko Unibersitatea, UPV, 48940 Leioa, Spain

The non-inactivating potassium M-current exerts a strong influence on neuronal excitability. The channels responsible for this current are made up of KCNQ subunits, and mutations in most of these produce human pathologies. Notably, in terms of excitation, mutations in either KCNQ2 or KCNQ3 lead to benign neonatal familial convulsions. Although a mere reduction of 25% in KCNQ2/3 function can increase excitability to epileptogenic levels, the potentiation of these subunits has anti-epileptogenic effects. After KCNQ2/3 heteromerization, current levels can augment as much as 10-fold, and we have discovered that there are three processes underlying this potentiation. First, there is an increase in the number of channels inserted in the membrane after heteromerization of the C-terminal region. Second, the N-terminal domain from KCNQ2 exerts a negative influence on the current level. Finally, Ala 315 of KCNQ3, a residue located in the inner vestibule after the selectivity filter, plays a critical role in preventing current flow in KCNQ3 homomeric channels, whereas it is permissive in heteromers in combination with Thr at the equivalent 276 position of KCNQ2.

Key words: Kv7; KCNQ; M-current; epilepsy; pore; surface expression

Introduction

Although there is a remarkable redundancy on the function “K⁺ permeation,” with >75 genes encoding potassium channels in the human genome (Gutman et al., 2003), mutations on some K⁺ channels provoke diseases (potassium channelopathies), indicating that their precise function cannot be completely replaced by other channels (Hubner and Jentsch, 2002). Approximately 10 potassium channel genes are known to be mutated in human disease, and, interestingly, four of these genes encode potassium channels of the Kv7 family, also known as KCNQ (Jentsch, 2000). Mutations in KCNQ1 (Kv7.1) lead to cardiac arrhythmia (Wang et al., 1996) and congenital deafness (Neyroud et al., 1997). Mutations in KCNQ4 (Kv7.4) produce a dominant form of progressive hearing loss (Kubisch et al., 1999). Finally, mutations in either KCNQ2 (Kv7.2) or KCNQ3 (Kv7.3) cause the same phenotype, benign familial neonatal convulsions (BFNC), a dominantly inherited epilepsy of the newborn (Biervert et al., 1998). Furthermore, some mutations in KCNQ2 produce a syndrome in which BFNC is followed later in life by myokimia (Dedek et al., 2001).

KCNQ2 and KCNQ3 can form heterotetramers that are expressed mainly in the nervous system (Biervert et al., 1998). They give rise to the “M-current” (Wang et al., 1998), which is active near the threshold of action potential firing and is inhibited by stimulating muscarinic acetylcholine receptors and other receptors that activate phospholipase C (Brown and Yu, 2000). Voltage dependency, slow kinetics, and non-inactivation are key properties that allow the M-type current to control neuronal excitability (Marrion, 1997). Furthermore, much attention has been paid to M-channel openers as possible targets for the treatment of neuronal disorders such as epilepsies, acute pain, neuropathic pain, migraine pain, and some neurodegenerative and psychiatric disorders (Gribkoff, 2003).

The importance of this current in neuronal excitability is illustrated by the fact that a functional impairment of <25% of KCNQ2/KCNQ3 heteromers appears to be sufficient to drive neurons to epileptogenic levels of excitability and causes BFNC in affected families (Schroeder et al., 1998). This observation also highlights the physiological importance of maintaining the activity of M-channels above a certain functional threshold. However, to date, limited information is available regarding the mechanisms that regulate the levels of M-channel activity. It is known that the number of channels at the membrane increases when KCNQ2 and KCNQ3 are coexpressed together in heterologous systems. This increase in the number of channels is paralleled by a concomitant increase in the current levels, leading to the proposal that it is at the basis of current potentiation (Schwake et al., 2000). We have investigated this issue in detail and show here that there are at least three mechanisms at work. Surprisingly, the increase in the number of channels plays only a secondary role.

Received June 29, 2004; accepted Aug. 31, 2004.

This work was supported by grants from the European Union (LSFM-CT-2004-50303), Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS01/1136), Comunidad de Madrid (08.5/0011/2001.1), and Ministerio de Educación y Ciencia (BFI2003-00693). A.E. was supported by a fellowship from the Basque Government. We thank Dr. Mark Sefton for critical comments and editorial assistance.

Correspondence should be addressed to Dr. Alvaro Villarroel, Unidad de Biofísica, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad del País Vasco (UPV)/Euskal Herriko Unibersitatea, UPV, Barrio Sarriena s/n, 48940 Leioa, Spain. E-mail: gbxvimua@lg.ehu.es.

M. Paz Regalado's present address: Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, Stanford University School of Medicine, 1201 Welch Road, Room P1154, Palo Alto, CA 94304-5485.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.3194-04.2004

Copyright © 2004 Society for Neuroscience 0270-6474/04/249146-07\$15.00/0

Materials and Methods

Chimeric KCNQ2/KCNQ3 channels. Human KCNQ2 (Y15065) and KCNQ3 (NM004519) cDNAs were kindly provided by Thomas Jentsch (Zentrum für Molekulare Neuropathobiologie, Hamburg, Germany). Silent restriction sites were introduced, and chimeric KCNQ2/KCNQ3 subunits were constructed by exchanging regions in KCNQ3 for the equivalent ones in KCNQ2 by site-directed cloning or by overlapping PCR. A *Sac*I restriction site was introduced within the codons for amino acids P89/R90 of KCNQ2 and P118/R119 of KCNQ3 and a *Bam*H I site within the codons for G310-L312 of KCNQ2 and G349-L351 of KCNQ3, at the beginning and at the end of the transmembrane region, respectively. When no restriction sites were available, the chimeras were constructed using a multistep PCR protocol using both subunits as templates. Point mutants were generated by PCR-based mutagenesis changing KCNQ3 residues for the equivalent ones in KCNQ2 and inversely. The amplified chimeric cassettes were confirmed by sequencing and replaced in a KCNQ3 backbone. Silent sites were introduced to facilitate the screening of positive clones.

Channel expression and electrophysiology. Channel subunits were flanked by the non-coding 5' region of the globin gene of *Xenopus* and the 3' polyA of SV40. After linearization of the cDNAs with *Apa*I, the cRNAs were synthesized *in vitro* with the T7 transcription kit (Ambion, Austin, TX). Oocyte preparation and electrophysiological recordings were performed as described previously (Villarreal and Schwarz, 1996). Stage V or VI oocytes were defolliculated enzymatically with collagenase (C9891; Sigma, Madrid, Spain), 1 mg/ml in Ca²⁺-free OR2, made with (in mM) 82.5 NaCl, 2.5 KCl, 1 MgCl₂, and 5 HEPES, pH 7.5, and then were transferred to a Ca²⁺-containing solution, ND96, consisting of (in mM) 96 NaCl, 2 KCl, 1.8 CaCl₂, 1 MgCl₂, and 5 HEPES, pH 7.5. The oocytes were injected with 50 nl of KCNQ2 or KCNQ3 cRNA solution, containing ~10 ng of KCNQ2 or KCNQ3 cRNA or 10 ng of a 1:1 mixture in coexpression experiments.

Three days after injection, whole-cell currents were recorded in oocytes at room temperature (~22°C) with a two-electrode voltage clamp using a virtual-ground Geneclamp 500B amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA). Borosilicate electrodes were filled with 3 M KCl and had resistances of ~1 MΩ. The oocytes were perfused continuously in *Xenopus* saline made with (in mM) 100 NaCl, 2.5 KCl, 1 MgCl₂, 2 MnCl₂, and 5 HEPES, pH 7.5. All chemicals, except stated otherwise, were from Sigma. Data were acquired at a sampling rate of 1 KHz and filtered at 100 Hz; voltage-step protocols and current analysis were performed with pCLAMP 8.1 software (Axon Instruments).

Current values represent the average (±SE) of the maximal conductance obtained from the fit of the g–V relationship to a Boltzmann equation:

$$y = G_{\max} / [1 + \exp((V_{1/2} - V_m) / \text{slope})],$$

where $G_{\max} = I_{\max} / (V_{\text{step}} - V_{\text{rev}})$, I_{\max} is the maximal current, V_{rev} is the reversal potential (-87.3 ± 0.34 mV; $n = 387$; in our recording conditions), y is the tail current amplitude in an 800 msec voltage step to -20 mV (V_{step}) elicited after 800 msec depolarizing voltage pulses from -120 to $+50$ mV in 10 mV increments (V_m) evoked every 10 sec, and $V_{1/2}$ is the membrane potential at which the current is half I_{\max} . To get the absolute amplitude, the tail current values were subtracted with the amplitude of the tail current preceded by a voltage step to -120 mV. The G_{\max} value was normalized to the averaged G_{\max} obtained the same day using five or more oocytes expressing KCNQ2/KCNQ3 heteromers.

To monitor the assembly of different subunits, the sensitivity to the blockage by tetraethylammonium (TEA) was measured (Hadley et al., 2003). Currents were elicited by an 800 msec depolarizing step from -60 to -20 mV every 20 sec. The percentage of inhibition was represented against the log [TEA], and curves were fitted with the Hill equation:

$$y = y_{\max} x^b / (x_0^b + x^b),$$

where y is the percentage of inhibition, y_{\max} is full inhibition, x is the concentration of the blocker, x_0 is the IC₅₀ value (the concentration at which inhibition reaches 50%), and b is the power equivalent to the Hill

slope. Data were normalized in Excel and plotted in SigmaPlot. For statistical evaluation, unpaired Student's *t* test was applied.

Surface expression. We followed the method described by Schwake et al. (2000), using the KCNQ3 subunit tagged with a hemagglutinin (HA) epitope in the extracellular loop that connects transmembrane domains S1 and S2 (kindly provided by T. Jentsch). Oocytes were injected with 20 ng of a 1:1 cRNA mixture that always included 10 ng of KCNQ3-HA. After 3 d at 19°C, the oocytes were placed in ND96 with 1% BSA (ND96/BSA) at 4°C for 30 min to block unspecific binding. Subsequently, the oocytes were incubated in ND96/BSA for 60 min at 4°C with 1 μg/ml rat monoclonal anti-HA antibody (3F10; Roche Diagnostics, Barcelona, Spain), washed with ND96/BSA, and incubated in ND96/BSA with HRP-coupled secondary antibody for 60 min (goat anti-rat antigen binding fragments; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Finally, the oocytes were washed thoroughly with ND96/BSA and then with ND96 alone to eliminate the background signal that BSA produces. Individual oocytes were placed in 50 μl Power signal ELISA solution (Pierce, Rockford, IL), and chemiluminescence was quantified in a Sirius luminometer (Berthold, Pforzheim, Germany).

Nomenclature. In the figures representing the chimeric channels, black is used for regions originating from KCNQ2 and white for those from KCNQ3 (see Fig. 1B). The transmembrane region is depicted as a box between two lines, which represent the N and C termini. These regions are referred to as T, N, or C, followed by the number of the original subunit, 2 or 3. Bold characters are used for segments originated from KCNQ2, whereas characters are underlined to indicate regions from KCNQ3. For example, **KCNQ2** will be represented as **N2T2C2** or often as **Q2** to abbreviate. Similarly, KCNQ3 will be referred to as N3T3C3 or Q3. In some chimeras, the pore region was exchanged (aa 253–291 and 282–330 in **Q2** and Q3, respectively), and it is referred to as P. For instance, when the pore region of KCNQ3 is replaced, the resulting construct is denominated N3T3P2C3.

Results

The transmembrane domain is critical for potentiation

When **KCNQ2** and KCNQ3 form heteromers, an increase in current has been detected in many expression systems (Wang et al., 1998; Selyanko et al., 2001). This potentiation is particularly dramatic in *Xenopus* oocytes, leading us to examine this phenomenon in this expression system in which only modest currents are obtained when KCNQ3 or **KCNQ2** subunits are expressed alone, and there is a remarkable 10-fold increase when both subunits are expressed together (Fig. 1A) (Wang et al., 1998). To investigate the mechanisms underlying this potentiation, we used chimeric **KCNQ2/3** channels to identify the molecular determinants involved.

The topology of KCNQ (Kv7) channels is similar to that of other Kv channels. It consists of intracellular N- and C-terminal regions, six transmembrane segments, and a loop between S5 and S6 that forms the pore (P). We conceptually divided the channel into three portions: N terminus, transmembrane, and C terminus (Fig. 1B). We will refer to these regions as N, T, or C, followed by the number of the original subunit, 2 or 3 (see Materials and Methods).

Chimeric subunits of the six possible combinations of these three segments were constructed and coexpressed with KCNQ3 (Fig. 1C). Because KCNQ3 alone does not generate currents above background levels, any current recorded will flow through heteromeric channels or homomeric chimeric channels. Both alternatives can be distinguished based on the differential sensitivity to the potassium channel blocker TEA (see below and Fig. 1F). The maximal conductance (G_{\max}) was estimated by fitting a Boltzmann distribution to the g–V relationships, which was averaged and normalized to **Q2**+Q3 control values obtained from the amplitudes of the tail currents measured at -20 mV (Fig. 1E, G).

In this way, the analysis became insensitive to shifts in the voltage dependency caused by the mutations.

Only three chimeras yielded currents that were clearly above background levels, and all contained the Q2 transmembrane segment (N3T2C2, N2T2C3, N3T2C3) (Fig. 1C,G). The sensitivity of these three chimeras to TEA, which depends on a key pore residue located within the transmembrane segment, was intermediate to that of homomeric Q2 or homomeric Q3 channels and was indistinguishable to that of Q2/Q3 heteromers (Fig. 1F). This indicates that these three chimeras efficiently assembled with Q3, forming heteromeric channels (Hadley et al., 2003). The failure to obtain significant current with the remaining three chimeras (N2T3C3, N3T3C2, N2T3C2) was not attributable to a gross defect in their biogenesis because currents were obtained when they were coexpressed with Q2 (see Fig. 3B) with intermediate TEA sensitivity (data not shown). Thus, a heteromeric transmembrane configuration is required for potentiation.

This result was unexpected because previous studies have suggested that an increase in surface expression mediated by the C terminus is the most likely basis for current potentiation (Schwake et al., 2000). We therefore examined how the different segments affect the number of KCNQ3 subunits at the membrane and found that the three chimeras containing the C terminus from Q2 stimulated Q3 surface expression, although to a lesser extent than Q2 itself (Fig. 1D). This small difference suggests that other regions play a minor role in the export of the channels to the membrane. Remarkably, the results show that the number of channels at the membrane does not correlate with the current flow and that the transmembrane segment is the most decisive region for current potentiation.

A residue in the inner pore vestibule is critical for the potentiation

We generated additional chimeras to further analyze the transmembrane domain. The chimera N3T3P2C3 (Q3/Q2_{253–291}), in which the pore region (P) was exchanged, potentiated the current even more than Q2, whereas N2T2P3C2 (Q2/Q3_{282–349}) and other chimeras with a Q3 pore produced little or no current. Hence, the smallest region of KCNQ2 needed for potentiation was that around the pore region (Fig. 2A). The functional channels again showed intermediate sensitivity to TEA, indicating the formation of heteromeric channels (data not shown).

In this region, a nonconserved domain forms an extracellular loop (Fig. 2B, gray box), which is followed by a highly conserved segment forming the selectivity filter (white box). When muta-

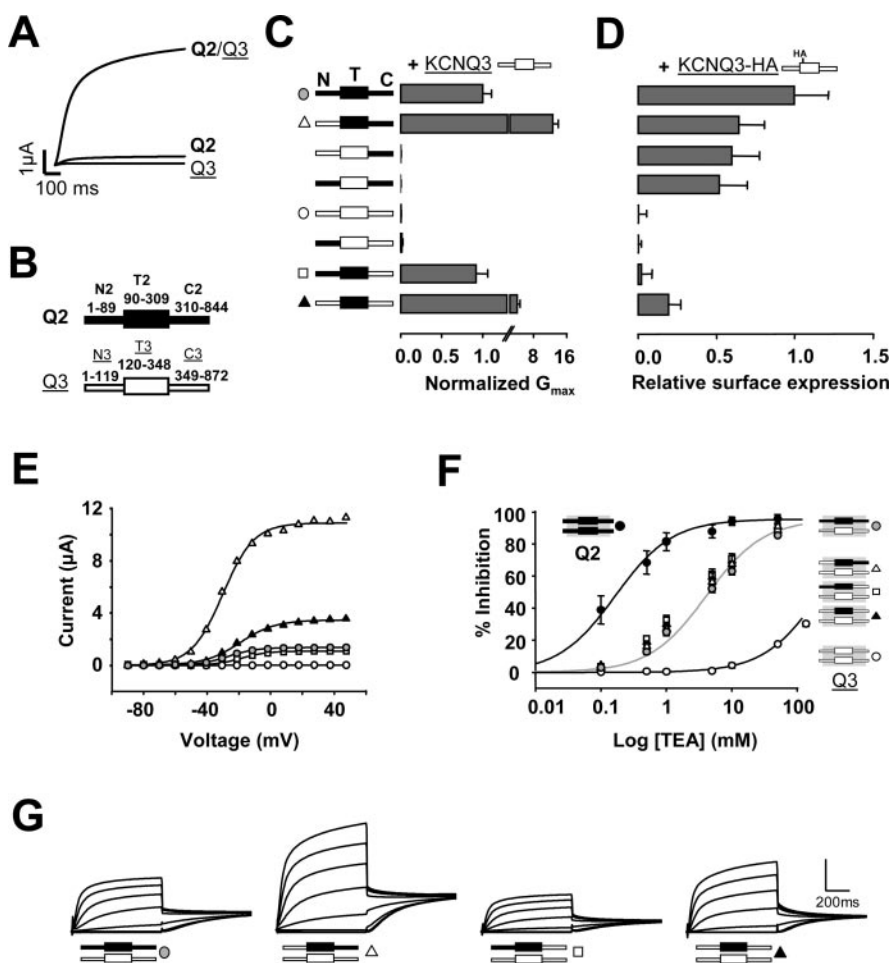


Figure 1. The transmembrane region is critical for Q2/Q3 potentiation. *A*, Current records evoked by 800 msec voltage steps to +50 mV from a holding potential of –50 mV of Q2, Q3, and Q2/Q3 channels. *B*, Schematic representation of the subunits. The figure indicates the amino acid boundaries for the three portions: N terminus (N), C terminus (C), and transmembrane region (T). The transmembrane region is depicted as a box; segments from Q2 are shaded in black, and those from Q3 are shaded in white. *C*, Left, Schematic representation of chimeric Q2/Q3 constructs. The averaged normalized maximal conductance obtained after fitting a Boltzmann distribution to *g*–*V* relationships (*E*) from tail currents measured at –20 mV (*G*) of the constructs indicated were coexpressed with Q3 in a 1:1 ratio ($n \geq 10$ from 2 or more batches of oocytes). *D*, Normalized surface expression of HA-tagged Q3 subunits after coexpression with the constructs indicated on the left ($n \geq 15$). Heteromerization of the C terminus increased the number of Q3 subunits at the membrane. The differences in the mean surface expression of the first four groups were not statistically significant. *E*, Representative conductance–voltage relationship of tail currents measured in 800 msec current traces at –20 mV for Q2/Q3 heteromers, Q3 homomers, and selected chimeric constructs coexpressed with Q3. Boltzmann distributions were fitted to the data (continuous lines). The averaged Boltzmann parameters were: Q2 + Q3 (gray circles): $V_{1/2} = -28.68 \pm 0.53$ mV, slope = 10.4 ± 0.15 mV ($n = 118$); N3T2C2 + Q3 (open triangles): $V_{1/2} = -32.79 \pm 2.26$ mV, slope = 10.3 ± 0.63 mV ($n = 11$); N2T2C3 + Q3 (open squares): $V_{1/2} = -22.02 \pm 1.07$ mV, slope = 11.5 ± 0.69 mV ($n = 11$); N3T2C3 + Q3 (filled triangles): $V_{1/2} = -19.80 \pm 1.50$ mV, slope = 12.6 ± 0.72 mV ($n = 9$). *F*, Dose–response curves for TEA blockage of Q2 (filled circles; $n = 6$), Q3 (empty circles; $n = 4$), Q2/Q3 (gray circles; $n = 15$). The solid lines are the result of fitting the Hill equation to the data with an IC_{50} value of ~ 0.16 mM for Q2, ~ 4.1 mM for Q2 + Q3, and > 200 mM for Q3. The data for Q3 was obtained with the A315T mutant to clearly evoke measurable currents (see Fig. 2C). *G*, Representative collection of 800 msec tail currents recorded at –20 mV evoked after 800 msec voltage steps from –120 to +50 mV evoked in oocytes held at –50 mV. The vertical bar represents 2.0 μ A, except for N3T2C2 + Q3 (open triangle), where it represents 6.0 μ A.

tions were introduced into the conserved region on a N3T3P2C3 background, a residue critical for potentiation was identified in the inner pore, corresponding to T276 in Q2 or A315 in Q3 (Fig. 2B). In addition, potentiation was abolished when the equivalent residue in Q2, **threonine 276**, was mutated to alanine (underlined). The mutant Q2 T276A produced a channel yielding small currents reminiscent of homomeric Q3 channels, even when coexpressed with KCNQ3 (Fig. 2C). Furthermore, the Q3A315T mutant yielded currents that were even larger than the reference Q2/Q3 currents when coexpressed with Q3A315T (i.e., ho-

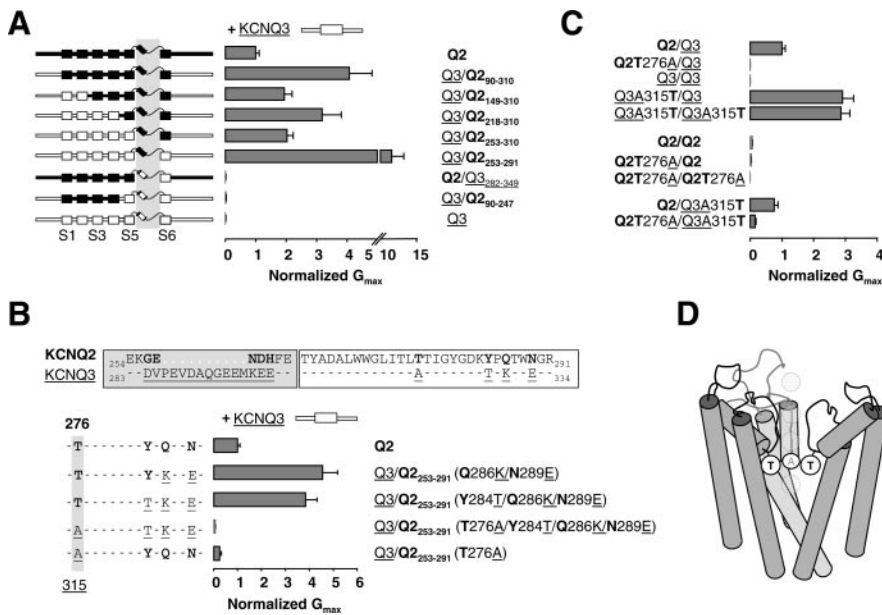


Figure 2. A residue located in the inner vestibule after the selectivity filter is critical for potentiation. *A*, Left, Schematic representation of the chimeras. The boxes indicate transmembrane segments, and the loop represents the pore between S5 and S6. Right, Normalized maximum conductances after coexpression with Q3 ($n > 10$ from 2 different batches). Chimeras containing the pore region from Q2 were able to increase the current, and the heteromeric nature of the channels was verified with TEA (see Fig. 1*F*). In contrast, those containing the pore from Q3 produced little or no current. *B*, Top, Alignment of the pore region of Q2 and Q3. The residues that differ between both subunits are indicated in bold. The gray box encompasses an extracellular loop, and the open box encompasses the pore. Bottom, Different residues were mutated in a Q3/Q2_{253–291} background to the equivalent ones in Q3. The normalized maximal conductance after coexpression with Q3 is plotted ($n > 4$). When the residue equivalent to threonine 276 of Q2 was changed to alanine, present at the equivalent position 315 in Q3, the current was reduced to Q3 homomeric levels. *C*, Normalized maximum conductance levels of different pore point mutants, expressed in pairs as indicated on the left ($n \geq 8$). *D*, Backbone of a homology model of the pore region of Q2/Q3 heteromers drawn to scale based on the structure of KcsA (Doyle et al., 1998), indicating the position of T276 and A315. A Q3 subunit located in the front view has been removed for clarity. K⁺ ions are represented as gray circles.

momers), or with Q3, but comparable with the reference when coexpressed with Q2 (Fig. 2*C*). This difference can be at least partially accounted for by the negative influence of the N2 segment (see below).

KCNQ3 homomeric channels show a delayed decline in the currents activated at voltages greater than +20 mV. This may be attributable to an inactivation process as observed for KCNQ1, but not in KCNQ2. Interestingly, a critical residue for KCNQ1 inactivation is located one position before the equivalent of the T/A position (Seeböhm et al., 2001). Similarly, the KCNQ3 A315T mutant channel did not inactivate, but inactivation appeared in the homomeric KCNQ2 T276A channels. These data imply that this residue plays an important role in the gating process associated with channel inactivation (data not shown).

The N-terminal region controls current amplitude

The data in Figure 1*C* from functional channels differing only in the N-terminal region are re-plotted in Figure 3*A* showing that those subunits with the N terminus from Q2 gave rise to significantly smaller conductances than those with the Q3 N terminus (Fig. 3*A*). Hence, we further explored the role of the N terminus by coexpressing these chimeras with Q2 (Fig. 3*B*). Again, when the N terminus from Q3 was replaced with the N terminus of Q2, the conductance clearly diminished, regardless of the transmembrane or the C-terminal configuration. The homomeric Q3 N-terminal configuration produced the greatest conductance levels and the homomeric Q2 configuration the least.

The three regions control current levels through quasi-independent mechanisms

By coexpressing pairs of the different chimeras, we could analyze heteromeric (*h*) or homomeric (Q2 or Q3) configurations of each region (N, T, or C) to determine whether the effect of the three regions on the current level was independent or not. Every combination within a group gave rise to comparable maximum conductance levels, as expected, if the control exerted by each of the three regions was independent of the others (Fig. 4). However, the data from set four indicate that the three mechanisms are not completely independent.

Set four shows the effect of having a homomeric C-terminal configuration, a region that controls the number of channels at the surface (Fig. 1*D*). Because the surface expression of the homomeric Q2 or Q3 channels is inefficient (Schwake et al., 2000), it was expected that the *NhThC2* or *NhThC3* channels should have given rise to lower current levels than Q2/Q3 (*NhThCh*), and this was the case for two of the combinations (N3T2C2 + N2T3C2 and N3T3C2 + N2C2T2; $p < 0.01$). Although the mean conductance value for the pair N2T3C3 + N3T2C3 was smaller than the Q2/Q3 reference value, the difference did not reach statistical significance. However, we found that coexpression of N2T2C3 with Q3 (*NhThC3*) consistently gave conductance levels indistinguishable from those obtained after coexpression of Q2 with Q3. Hence, apart from controlling the number of available channels, the C terminus may also be affecting the current levels by another mechanism (Maljevic et al., 2003; Li et al., 2004). In line with this idea, as has been also noted by others (Maljevic et al., 2003), we observed that there was a systematic shift in the $V_{1/2}$ of the *g*-*V* relationship depending on the C-terminal configuration (data not shown). Because the configuration of the C terminus changed from Q2, to heteromeric, to Q3, the $V_{1/2}$ shifted to a more depolarized potential (data not shown), suggesting that the C terminus of Q2 might stabilize the open configuration or make the closed conformation more unstable.

Discussion

We show here that three mechanisms underlie the potentiation after heteromerization of KCNQ2/KCNQ3 channels and provide additional evidence for the modular design of K⁺ channels, with different regions serving separate functions in an almost independent manner. The current flow depends on the product of three parameters: *N* (number of channels); P_o (probability of the channel being open); and γ (single-channel conductance). In KCNQ channels, *N* clearly depends on the intracellular C terminus (Schwake et al., 2000). However, we surprisingly found that in *Xenopus* oocytes there is no correlation between the number of channels at the membrane and the current, and both the N-terminal and the transmembrane regions play prominent roles in the potentiation process.

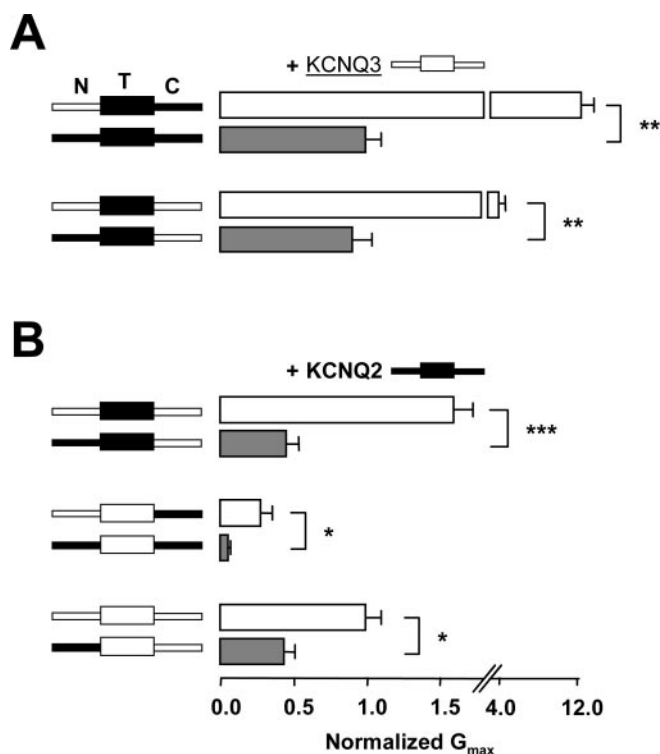


Figure 3. The N-terminal region regulates the degree of potentiation. *A*, Normalized maximal conductance of the chimeras indicated on the left coexpressed with Q_3 . The data from Figure 1C is replotted here to highlight the effect of the N terminus. *B*, Normalized maximal conductance of the chimeras indicated on the left coexpressed with Q_2 ($n > 8$). Statistically significant differences are indicated by asterisks: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

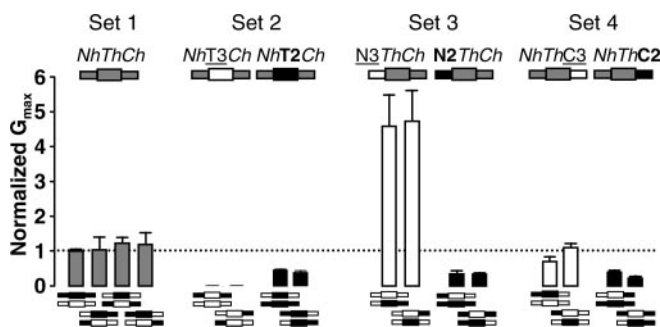


Figure 4. The N-terminal, transmembrane, and C-terminal segments control maximal current levels through quasi-independent mechanisms. Pairs of chimeras represented below each bar were coexpressed, creating seven configurations that were either homomeric or heteromeric at the N-terminal, transmembrane, or C-terminal segments. The resulting configuration is color coded in the schematic representation of the channel above the bars, using gray for the heteromeric configuration, black for the Q_2 homomeric configuration, and white for the Q_3 homomeric configuration of each segment. The configurations were grouped into four sets: (1) $N_{het}T_{het}C_{het}$; (2) $N_{het}T_{homo}C_{het}$; (3) $N_{homo}T_{het}C_{het}$; (4) $N_{het}T_{het}C_{homo}$ (het, heteromeric; homo, homomeric). In sets two to four, there were two groups differing in the homomeric configuration (Q_2 or Q_3) of one segment (N, T, or C). Each combination within a group gave rise to comparable maximum conductance levels ($n \geq 6$), revealing that each region (N, T, and C) controls the maximum conductance level through a mechanism that is independent of the other segments. The difference of the means of the pair $NhThC_3$ in set 4 was not statistically significant. The mean conductance for all constructs and the reference mean conductance were statistically different ($p < 0.01$), except for the chimeras in set 1 and the pairs that from the configuration $NhThC_3$ in set 4.

The C-terminal domain controls the number of channels at the membrane

Although the number of channels at the membrane increases after heteromerization of the C-terminal region, Schwake et al.

(2000) have shown that the total protein levels stay relatively constant, ruling out stabilization of the channel to explain the increase in surface expression. Thus, retention/retrieval or export signals may be masked or unmasked after heteromerization. In the C terminus, there are four regions with high probability of forming an α helix (helices A–D) (Yus-Najera et al., 2002). Clusters of positively charged residues reminiscent of retention/retrieval signals (Teasdale and Jackson, 1996; Ma and Jan, 2002) are present at the end (Lerche et al., 1999) and close to helix C. This is intriguing because helix C makes up the assembly domain (Maljevic et al., 2003; Schwake et al., 2003), and it could easily be envisaged that putative retention signals close to this helix could be concealed after channel assembly.

Surface expression appears to be also regulated by other regions, because all chimeras were less efficient than Q_2 at promoting Q_3 traffic to the membrane (Fig. 1D). In fact, residues located in the transmembrane region of Kv1.1 channels (Manganas et al., 2001; Zhu et al., 2001) and the distantly related GluR2 receptor (Greger et al., 2003) are involved in the folding and therefore in the trafficking of the channel. Nevertheless, although it appears that the overall structure of the pore loop of GluR2 is critical for tetramerization and exit from the endoplasmic reticulum (Greger et al., 2003), it remains to be determined whether the T/A site in the pore loop of KCNQ2/3 plays a similar role.

Other parameters that influence current levels also appear to be affected by the C terminus (Maljevic et al., 2003; Li et al., 2004), because when $KCNQ_3$ was coexpressed with the $N_2T_2C_3$ chimera, the number of channels at the surface was very small (Fig. 1D), yet the maximal current was similar to that obtained after coexpression with $N_2T_2C_2$ (Figs. 1C, 4).

The N-terminal domain may affect the maximal open probability

In the presence of a heteromeric pore arrangement, the N terminus had a greater influence on the maximal conductance than the C terminus. The largest conductance levels were obtained with a homomeric Q_3 N-terminal configuration, and the homomeric Q_2 N-terminal configuration produced the lowest current.

The small impact of the N terminus in the number of channels at the membrane contrasts with its effect on the maximal conductance. For instance, we found that by switching from a heteromeric to homomeric Q_3 N-terminal configuration, the 10–40% reduction in the number of channels at the membrane was accompanied by a sixfold increase in maximal conductance. Thus, the N terminus must mainly affect $P_o \cdot \gamma$.

We favor the idea that the N terminus affects P_o , rather than γ , because the differences of single-channel conductance measured for homomeric $KCNQ_3$ and heteromeric channels cannot account for the increase in maximal current (Schwake et al., 2000; Selyanko et al., 2001). This idea is in agreement with the reduction in P_o observed after heteromerization in Chinese hamster ovary cells (Selyanko et al., 2001) but clashes with the increase estimated by nonstationary noise analysis in oocytes (Schwake et al., 2000). The different estimates for maximal P_o of homomeric Q_3 channels ranges from 0.4 to 0.9 (Schwake et al., 2000; Selyanko et al., 2001; Li et al., 2004). Changes in maximal P_o could, at best, lead to a 2.5-fold increase in conductance. In contrast, the estimates for maximal P_o for homomeric Q_2 ranges from 0.15 to 0.61. The lower estimate of P_o is more in line with our results and permits a 6.7-fold increase in conductance. Thus, the P_o dynamic range is larger for Q_2 channels than for Q_3 subunits. It has been proposed that the C terminus is responsible for this differential property (Li et al., 2004). We propose that the N terminus is also

contributing significantly to the maximal P_o attainable. Given the weak conservation in the N terminus across the Kv7 family and its important effect on KCNQ channel function, this region may be a good target for developing more specific therapeutic drugs for the treatment of diverse neurological conditions (Gribkoff, 2003).

Role of the pore residue in potentiation

We have identified A315 as a residue in the inner pore vestibule of KCNQ3 subunits that critically controls channel activity, and that exerts a strong negative effect on current flow. When the four subunits of the tetrameric channel have an alanine at this position, either in a KCNQ3 or a KCNQ2 backbone, the current levels are close to the background, even when a considerable number of channels are in the membrane. In heteromers, this negative effect is neutralized by the threonine at the equivalent 276 position in Q2. Interestingly, the other functional partners of KCNQ3 (Q4 and Q5) also have a threonine at the equivalent position.

A comparison of the 75 known human potassium channels (Gutman et al., 2003) reveals a high degree of conservation at this position, it being occupied by threonine in 66 subunits. The only other subunit that has an alanine is $K_{ir}3.1$ (A142), which belongs to the G-protein-gated inwardly rectifying channels (also named GIRK). Interestingly, this subunit does not produce functional homomeric channels, and it associates with other family members to enhance their activities (Chan et al., 1996). Nevertheless, the role of alanine 142 in $K_{ir}3.1$ remains unclear. In *Shaker* channels, the mutation of the equivalent threonine 441 to alanine does not impair channel function, and this position is not sensitive to gating in double-cycle mutation analysis (Yifrach and MacKinnon, 2002). Mutations at this position in KCNQ2 (T276S) and other potassium channels alter ionic selectivity, increasing the conductance of some ions (Prole and Marrion, 2004). However, various single-channel analyses indicate that there is no change or only a mild increase in conductance after heteromerization (Schwake et al., 2000; Selyanko et al., 2001), which is insufficient to explain the potentiation of the current.

One intriguing possibility is that this residue shapes a binding site for an endogenous blocking molecule. Mutational analysis in KCNQ2, $K_{ir}2.1$ and *Shaker* is consistent with the involvement of T276/A315 in an intracellular ionic block (Yellen et al., 1991; Zhou et al., 1996; Alagem et al., 2001; Slesinger, 2001; Prole and Marrion, 2004). Indeed, the corresponding T623 is critical for anti-arrhythmic drug blockage of human ether-à-go-go related gene channels (Mitcheson et al., 2000), and in KCNQ1 there are important determinants for benzodiazepine channel block in the neighborhood of this residue (Seebohm et al., 2001). In addition, the Q/R site that participates in the blockage of AMPA receptors by the naturally occurring polyamines is located in the vicinity of the residue equivalent to T276/A315 of KCNQs (Bowie and Mayer, 1995). In summary, there is ample evidence to suggest that this residue might contribute to a binding pocket. Hence, we would expect that homomeric KCNQ3 channels could be suppressed to varying degrees depending on the concentration of the putative blocker. Should a natural ligand exist for this site, *Xenopus* oocytes may provide an abundant source for its identification, because relative KCNQ3 homomeric current levels are much lower than in other expression systems.

In summary, compared with homomeric KCNQ3 channels, after heteromerization there is an increase in the number of KCNQ3 channels at the membrane and a reduction in P_o because of the presence of the Q2 N-terminal segment. In addition to a possible effect on single-channel conductance, two possible roles

should be considered for the site in the inner vestibule of the pore. It may affect assembly and membrane expression and/or the formation of a binding pocket for a hypothetical endogenous blocker.

References

- Alagem N, Dvir M, Reuveny E (2001) Mechanism of Ba^{2+} block of a mouse inwardly rectifying K^+ channel: differential contribution by two discrete residues. *J Physiol (Lond)* 534:381–393.
- Biervert C, Schroeder BC, Kubisch C, Berkovic SF, Propping P, Jentsch TJ, Steinlein OK (1998) A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science* 279:403–406.
- Bowie D, Mayer ML (1995) Inward rectification of both AMPA and kainate subtype glutamate receptors generated by polyamine-mediated ion channel block. *Neuron* 15:453–462.
- Brown BS, Yu SP (2000) Modulation and genetic identification of the M channel. *Prog Biophys Mol Biol* 73:135–166.
- Chan KW, Sui JL, Vivaudou M, Logothetis DE (1996) Control of channel activity through a unique amino acid residue of a G protein-gated inwardly rectifying K^+ channel subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:14193–14198.
- Dedek K, Kunath B, Kananura C, Reuner U, Jentsch TJ, Steinlein OK (2001) Myokymia and neonatal epilepsy caused by a mutation in the voltage sensor of the KCNQ2 K^+ channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:12272–12277.
- Doyle DA, Morais CJ, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K^+ conduction and selectivity. *Science* 280:69–77.
- Greger IH, Khatri L, Kong X, Ziff EB (2003) AMPA receptor tetramerization is mediated by Q/R editing. *Neuron* 40:763–774.
- Gribkoff VK (2003) The therapeutic potential of neuronal KCNQ channel modulators. *Expert Opin Ther Targets* 7:737–748.
- Gutman GA, Chandy KG, Adelman JP, Aiyar J, Bayliss DA, Clapham DE, Covarrubias M, Desir GV, Furuichi K, Ganetzky B, Garcia ML, Grissmer S, Jan LY, Karschin A, Kim D, Kuperschmidt S, Kurachi Y, Lazdunski M, Lesage F, Lester HA, et al. (2003) International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. *Pharmacol Rev* 55:583–586.
- Hadley JK, Passmore GG, Tatulian L, Al-Qatari M, Ye F, Wickenden AD, Brown DA (2003) Stoichiometry of expressed KCNQ2/KCNQ3 channels and subunit composition of native ganglionic M-currents deduced from block by tetraethylammonium (TEA). *J Neurosci* 23:5012–5019.
- Hubner CA, Jentsch TJ (2002) Ion channel diseases. *Hum Mol Genet* 11:2435–2445.
- Jentsch TJ (2000) Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease. *Nat Rev Neurosci* 1:21–30.
- Kubisch C, Schroeder BC, Friedrich T, Lutjohann B, El-Amraoui A, Marlin S, Petit C, Jentsch TJ (1999) KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell* 96:437–446.
- Lerche H, Biervert C, Alekov AK, Schleithoff L, Lindner M, Klingner W, Bretschneider F, Mitrovic N, Jurkat-Rott K, Bode H, Lehmann-Horn F, Steinlein OK (1999) A reduced K^+ current due to a novel mutation in KCNQ2 causes neonatal convulsions. *Ann Neurol* 46:305–312.
- Li Y, Gamper N, Shapiro MS (2004) Single-channel analysis of KCNQ K^+ channels reveals the mechanism of augmentation by a cysteine-modifying reagent. *J Neurosci* 24:5079–5090.
- Ma D, Jan LY (2002) ER transport signals and trafficking of potassium channels and receptors. *Curr Opin Neurobiol* 12:287–292.
- Maljevic S, Lerche C, Seebohm G, Alekov AK, Busch AE, Lerche H (2003) C-terminal interaction of KCNQ2 and KCNQ3 K^+ channels. *J Physiol (Lond)* 548:353–360.
- Manganas LN, Wang Q, Scannevin RH, Antonucci DE, Rhodes KJ, Trimmer JS (2001) Identification of a trafficking determinant localized to the Kv1 potassium channel pore. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:14055–14059.
- Marrion NV (1997) Control of M-current. *Annu Rev Physiol* 59:483–504.
- Mitcheson JS, Chen J, Lin M, Culbertson C, Sanguinetti MC (2000) A structural basis for drug-induced long QT syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:12329–12333.
- Neyroud N, Tesson F, Denjoy I, Leibovici M, Donger C, Barhanin J, Faure S, Gary F, Coumel P, Petit C, Schwartz K, Guicheney P (1997) A novel

- mutation in the potassium channel gene KVLQT1 causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome. *Nat Genet* 15:186–189.
- Prole DL, Marrion NV (2004) Ionic permeation and conduction properties of neuronal KCNQ2/KCNQ3 potassium channels. *Biophys J* 86:1454–1469.
- Schroeder BC, Kubisch C, Stein V, Jentsch TJ (1998) Moderate loss of function of cyclic-AMP-modulated KCNQ2/KCNQ3 K⁺ channels causes epilepsy. *Nature* 396:687–690.
- Schwake M, Pusch M, Kharkovets T, Jentsch TJ (2000) Surface expression and single channel properties of KCNQ2/KCNQ3, M-type K⁺ channels involved in epilepsy. *J Biol Chem* 275:13343–13348.
- Schwake M, Jentsch TJ, Friedrich T (2003) A carboxy-terminal domain determines the subunit specificity of KCNQ K⁺ channel assembly. *EMBO Rep* 4:76–81.
- Seebohm G, Scherer CR, Busch AE, Lerche C (2001) Identification of specific pore residues mediating KCNQ1 inactivation. A novel mechanism for long QT syndrome. *J Biol Chem* 276:13600–13605.
- Selyanko AA, Hadley JK, Brown DA (2001) Properties of single M-type KCNQ2/KCNQ3 potassium channels expressed in mammalian cells. *J Physiol (Lond)* 534:15–24.
- Slesinger PA (2001) Ion selectivity filter regulates local anesthetic inhibition of G-protein-gated inwardly rectifying K⁺ channels. *Biophys J* 80:707–718.
- Teasdale RD, Jackson MR (1996) Signal-mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:27–54.
- Villarroel A, Schwarz TL (1996) Inhibition of the Kv4 (Shal) family of transient K⁺ currents by arachidonic acid. *J Neurosci* 16:2522–2532.
- Wang HS, Pan Z, Shi W, Brown BS, Wymore RS, Cohen IS, Dixon JE, McKinnon D (1998) KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: molecular correlates of the M-channel. *Science* 282:1890–1893.
- Wang Q, Curran ME, Splawski I, Burn TC, Millholland JM, VanRaay TJ, Shen J, Timothy KW, Vincent GM, de Jager T, Schwartz PJ, Toubin JA, Moss AJ, Atkinson DL, Landes GM, Connors TD, Keating MT (1996) Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat Genet* 12:17–23.
- Yellen G, Jurman ME, Abramson T, MacKinnon R (1991) Mutations affecting internal TEA blockade identify the probable pore-forming region of a K⁺ channel. *Science* 251:939–942.
- Yifrach O, MacKinnon R (2002) Energetics of pore opening in a voltage-gated K⁺ channel. *Cell* 111:231–239.
- Yus-Najera E, Santana-Castro I, Villarroel A (2002) The identification and characterization of a noncontinuous calmodulin-binding site in noninactivating voltage-dependent KCNQ potassium channels. *J Biol Chem* 277:28545–28553.
- Zhou H, Chepilko S, Schutt W, Choe H, Palmer LG, Sackin H (1996) Mutations in the pore region of ROMK enhance Ba²⁺ block. *Am J Physiol* 271:C1949–C1956.
- Zhu J, Watanabe I, Gomez B, Thornhill WB (2001) Determinants involved in Kv1 potassium channel folding in the endoplasmic reticulum, glycosylation in the Golgi, and cell surface expression. *J Biol Chem* 276:39419–39427.