



**HAL**  
open science

# Les bases moléculaires du mécanisme d'action des ouvreurs potassiques sur les canaux K ATP

Christophe J Moreau

► **To cite this version:**

Christophe J Moreau. Les bases moléculaires du mécanisme d'action des ouvreurs potassiques sur les canaux K ATP. Biologie structurale [q-bio.BM]. Université Joseph Fourier (Grenoble 1), 2002. Français. NNT: . tel-03534013

**HAL Id: tel-03534013**

**<https://hal.univ-grenoble-alpes.fr/tel-03534013>**

Submitted on 19 Jan 2022

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**Université Joseph Fourier – GRENOBLE 1**  
**UFR de BIOLOGIE**

**Thèse**

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR ès SCIENCE DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER**

**Discipline : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie**

présentée et soutenue publiquement

par

**Christophe MOREAU**

le 21 mars 2002

**Titre :**

**Les bases moléculaires du mécanisme d'action  
des ouvreurs potassiques sur les canaux  $K_{ATP}$ .**

---

Directeur de thèse :

**M. Michel VIVAUDOU**

---

Jury

**Président : M. Jean VERDETTI**

**Rapporteur : M. Alexandre GHAZI**

**Rapporteur : M. Eric HONORE**

**Examineur : M. Laurent GROS**

*"Ecrire, c'est parler sans être interrompu"*

Jules Renard

Me voici donc un bavard ignoré !

Grands mercis en premier lieu à mes parents qui ont dû supporter ma ténacité dans les études qui se clôturent "enfin" par ce mémoire de thèse.

Je tiens également à remercier Yves Dupont et Florent Guillain pour m'avoir accueilli à différentes périodes dans leur laboratoire, pour avoir supporté mes sauts d'indépendances peu convenables, certes, mais jamais malveillants, et pour les bons conseils qu'ils ont su me prodiguer dans mes moments de doutes.

Il me faut également avouer, que ce fût pour moi une chance extraordinaire et un immense plaisir d'être encadré par un Monsieur que je respecte énormément, en la personne de Michel Vivaudou. Merci Michel pour tout ce que tu m'as enseigné durant toutes ces années.

L'équipe ABC m'a également beaucoup appris sur le plan professionnel, mais surtout sur les qualités humaines. Chronologiquement, merci à M<sup>me</sup> Nath (pour la peinture du midi), à M<sup>me</sup> Hélène (pour avoir été le témoin de jolis moments de sa vie), à Anne-Lise (pour sa complicité et son efficacité), à Ju (pour son Amitié et son honnêteté), à Fabienne (pour son autonomie et sa douceur), à Mylène (pour sa franchise, nos conversations et son enseignement du métier de parents), à Babeth (pour son rire sincère et son punch), ainsi qu'à Jean et Renaud qui m'ont principalement connu greffé à mon ordinateur.

Ma chance ne s'arrête pas à l'équipe de Michel puisque le laboratoire comprend nombre de modèles d'humanité et de bonté. Merci à Roger (pour son Amitié que je sais précieuse et pour ses réconforts), à Jean-Luc (pour son immense bonté et sa grande disponibilité), à Miche (pour son dynamisme et nos conversations d'idéalistes), à Pat (pour être un chercheur et un père modèle), à Martine (pour toute sa Joie et son soutien), à Ely (pour son aide précieuse et son honnêteté), à Michel F (pour son écoute et son appui toujours souriant), à Serge (pour sa grande disponibilité et sa gentillesse), à Vincent (pour nos saluts du matin et tous ses bons conseils), à Marc (pour l'Aventure vécue en plein vol et pour ses recommandations), merci également à tous les "jeunes" du laboratoire pour tous leurs rires qui ont su créer cette ambiance si agréable au laboratoire.

Merci également aux Amis du "C3", je pense à Véro, Thierry, Alexandra P, Alexandra R, Sylvia, à tout le labo CIS (et notamment Christophe pour tous ses conseils et ses recommandations), au personnel de la direction du DBMS, au bureau d'AITAP, qui m'ont tous très souvent généreusement aidé. Merci aussi à la Ligue Nationale contre le Cancer qui m'a soutenue durant ces trois années de thèse.

Un immense merci à Cath, Jean-Luc, KTY et Manu pour leurs corrections nécessaires (!).

Non je n'ai pas oublié mes Amis, ni les "grosses têtes", à qui je fais un merci très spécial car leur Amitié est inestimable et leur présence m'ont souvent donné foi dans la nature humaine et l'envie de la transmettre.

Tout naturellement, mon dernier remerciement est adressé à celle qui est source de mes rêves et qui m'accompagnera pour transmettre ces valeurs.

# SOMMAIRE

<b>INDEX DES ILLUSTRATIONS ET TABLEAUX</b>	<b>9</b>
<b>SIGLES ET ABRÉVIATIONS</b>	<b>11</b>
<b>1. INTRODUCTION</b>	<b>16</b>
<b>2. LES CANAUX IONIQUES</b>	<b>18</b>
<b>2.1. Introduction</b>	<b>18</b>
<b>2.2. Lois et définitions en électrophysiologie</b>	<b>20</b>
<b>2.3. La famille des canaux ioniques</b>	<b>22</b>
<b>2.3.1. Les canaux activés par le potentiel</b>	<b>23</b>
2.3.1.1. Les canaux $Na^+$	23
2.3.1.2. Les canaux $K^+$	25
2.3.1.2.1. Les canaux Kv	26
2.3.1.2.2. Les canaux KCNQ	28
2.3.1.2.3. Les canaux $K^+$ de type Eag (HERG)	28
2.3.1.3. Les canaux $Ca^{2+}$	29
2.3.1.4. Les canaux $Cl^-$	32
<b>2.3.2. Les canaux activés par les ions</b>	<b>33</b>
2.3.2.1. $K_{Ca}$	33
2.3.2.2. $K_{Na}$	35
2.3.2.3. $K_{ATP}$	36
<b>2.3.3. Les canaux directement activés par des récepteurs</b>	<b>36</b>
<b>2.3.4. Les canaux modulés par les nucléotides cycliques</b>	<b>36</b>
<b>2.3.5. Les canaux mécanosensibles</b>	<b>38</b>
<b>2.3.6. Les canaux induits par les cytolysines</b>	<b>38</b>
<b>2.3.7. Les canaux endocellulaires</b>	<b>39</b>
2.3.7.1. Le récepteur à la ryanodine	39
2.3.7.2. Le récepteur de l'inositol 5'-triphosphate	39
<b>2.3.8. Les canaux potassiques rectifiants entrants</b>	<b>40</b>
2.3.8.1. Structure des canaux Kir	41
2.3.8.2. Les différentes sous-familles de canaux Kir	45
2.3.8.2.1. Kir1.x	45

2.3.8.2.2. Kir2.x	45
2.3.8.2.3. Kir3.x	45
2.3.8.2.4. Kir4.x et Kir5.x	46
2.3.8.2.5. Kir6.x	46
2.3.8.2.6. Kir7.1	46
2.3.8.3. Modulation	47
<b>2.4. Pharmacologie des canaux K<sup>+</sup></b>	<b>47</b>
<b>3. LES TRANSPORTEURS ABC</b>	<b>49</b>
<b>3.1. MRP/CFTR</b>	<b>50</b>
3.1.1. MRP1	51
3.1.2. MRP2	51
3.1.3. MRP3, MRP4, MRP5 et MRP6	51
3.1.4. CFTR	52
3.1.5. SUR	52
<b>3.2. MDR/TAP</b>	<b>53</b>
3.2.1. P-gp	53
3.2.2. MDR3 et BSEP	53
3.2.3. TAP1 et TAP2	53
3.2.4. ABC7	53
<b>3.3. ALD</b>	<b>54</b>
3.3.1. ALD	54
3.3.2. PMP70	54
3.3.3. PMP69	54
<b>3.4. ABC1</b>	<b>54</b>
3.4.1. ABC1	55
3.4.2. ABC2	55
3.4.3. ABC3	55
3.4.4. ABCR	55
<b>3.5. White</b>	<b>56</b>
3.5.1. ABCG1 (White/ABC8)	56
3.5.2. ABCG2 (MXR1/BCRP/ABCP)	56
<b>3.6. GCN20</b>	<b>57</b>

3.7. OABP	57
3.8. Les transporteurs ABC d'autres organismes	58
3.9. Structure des transporteurs ABC	58
3.9.1. Structure des NBD	59
3.9.2. Structure complète d'un transporteur ABC	63
4. LES CANAUX $K_{ATP}$	70
4.1. Historique	70
4.2. Localisation tissulaire des canaux $K_{ATP}$	72
4.3. Rôles physiologiques	73
4.4. Canalopathie	75
4.5. Propriétés électrophysiologiques	76
4.6. Régulation	78
4.6.1. Régulateurs physiologiques	78
4.6.2. Pharmacologie des canaux $K_{ATP}$	78
4.7. Kir6.x	79
4.7.1. Kir6.1	79
4.7.2. Kir6.2	80
4.7.2.1. Taille, séquence et structure	80
4.7.2.2. Régulation	81
4.8. SUR	83
4.8.1. Taille, gènes, sites consensus	84
4.8.1.1. SUR1	84
4.8.1.2. SUR2A	85
4.8.1.3. SUR2B	85
4.9. Le complexe octamérique	85
4.9.1. Kir6.2 + SUR1	87
4.9.2. Kir6.2 + SUR2A	88
4.9.3. KIR6.2 + SUR2B	88
4.9.4. Kir6.1 + SUR1	88
4.9.5. Kir6.1 + SUR2B	89

<b>4.10. Régulation du canal par la sous-unité SUR</b>	<b>89</b>
<b>4.10.1. Les ligands endogènes</b>	<b>89</b>
4.10.1.1. MgADP	90
4.10.1.2. MgATP	92
4.10.1.3. PIP <sub>2</sub> et PIP	93
4.10.1.4. Les neurohormones	93
4.10.1.5. Les protéines G	94
4.10.1.6. L'endosulfine	94
<b>4.10.2. Les effecteurs synthétiques</b>	<b>94</b>
4.10.2.1. Les sulfonylurées et les bloqueurs	94
Localisation du site d'action des bloqueurs	95
4.10.2.2. Les ouvreurs potassiques	96
Mécanisme d'action des ouvreurs (sujet de cette thèse)	97
<b>5. Matériel et Méthodes</b>	<b>100</b>
<b>5.1. Biologie moléculaire</b>	<b>101</b>
<b>5.1.1. Matériel biologiques</b>	<b>101</b>
5.1.1.1. Clones disponibles	101
5.1.1.2. Bactérie compétente	102
5.1.1.3. <i>Xenopus laevis</i>	102
<b>5.1.2. Méthodes de biologie moléculaire</b>	<b>103</b>
5.1.2.1. Construction des protéines chimériques	103
5.1.2.2. Mutagenèse dirigée par PCR	105
5.1.2.3. Transformation des bactéries compétentes	106
5.1.2.4. Miniprep d'ADN	107
5.1.2.5. MidiPrep d'ADN	107
5.1.2.6. Séquençage	107
5.1.2.7. Transcription	108
<b>5.2. Expression hétérologue du canal KATP</b>	<b>109</b>
<b>5.3. Caractérisation fonctionnelle</b>	<b>110</b>
<b>5.3.1. Principe de la technique du Patch-Clamp</b>	<b>110</b>
<b>5.3.2. Les configurations du patch clamp</b>	<b>111</b>
<b>5.3.3. Instrumentation et poste opératoire (Figure 33)</b>	<b>112</b>
<b>5.3.4. Conditions expérimentales</b>	<b>115</b>

<b>6. RÉSULTATS ET INTERPRÉTATIONS</b>	<b>119</b>
<b>6.1. Interactions nucléotides-ouvriers potassiques</b>	<b>119</b>
<b>6.1.1. Principe</b>	<b>119</b>
<b>6.1.2. Méthodes</b>	<b>119</b>
<b>6.1.3. Résultats et interprétations</b>	<b>120</b>
6.1.3.1. <i>Le diazoxide a également un effet sur SUR2A</i>	120
6.1.3.2. <i>L'activité ATPase du récepteur des sulfonylurées</i>	123
6.1.3.3. <i>Interactions différentes entre les ouvriers et les NBD</i>	125
<b>6.2. Localisation du site de fixation des ouvriers</b>	<b>127</b>
<b>6.2.1. Principe</b>	<b>127</b>
<b>6.2.2. Méthodes</b>	<b>127</b>
<b>6.2.3. Résultats et interprétations</b>	<b>128</b>
<b>7. DISCUSSION</b>	<b>138</b>
<b>7.1. Le site de liaison des ouvriers</b>	<b>138</b>
<b>7.1.1. Les différentes hypothèses</b>	<b>138</b>
<b>7.1.2. PIP<sub>2</sub></b>	<b>142</b>
7.1.2.1. <i>Run down et flippase</i>	143
<b>7.1.3. Proposition de poursuite du projet</b>	<b>145</b>
<b>7.2. Interaction NBD-ouvriers</b>	<b>146</b>
<b>7.3. Modèle à activation constante</b>	<b>148</b>
<b>8. CONCLUSION</b>	<b>155</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>158</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>176</b>

## INDEX DES ILLUSTRATIONS ET TABLEAUX

### Les figures :

Figure 1 : Rectification dose-dépendante de Kir1.1 due au magnésium intracellulaire .....	21
Figure 2 : Déplacement de l'hélice S4 (voltage-sensor) en fonction de la variation du potentiel de membrane .....	23
Figure 3 : Prédiction de structure des canaux Na <sup>+</sup> voltage dépendants .....	24
Figure 4 : Les différents types de canaux potassiques voltage-dépendants.....	26
Figure 5 : Prédiction de structure des canaux HERG et les mutations associées à LQT2.....	29
Figure 6 : Prédiction de structure des différentes sous-unités des canaux calciques voltage-dépendants .....	31
Figure 7 : Prédiction de structure des canaux chlorure voltage-dépendants .....	33
Figure 8 : Prédiction de structure des deux sous-unités des canaux BK.....	35
Figure 9 : Structure du canal KcsA .....	43
Figure 10 : Site de fixation des ions K <sup>+</sup> dans le canal KcsA.....	43
Figure 11 : Cycle des liaisons électrostatiques pour la traversée des ions K <sup>+</sup> .....	44
Figure 12 : Modèle proposé de variations structurales du filtre de sélectivité en fonction de l'état de la porte et de la concentration en ions potassiques.....	45
Figure 13 : Architecture modulaire des transporteurs ABC.....	50
Figure 14 : Structures super-secondaires de HisP .....	60
Figure 15 : Les deux modèles de dimérisation des NBD .....	61
Figure 16 : Structure tridimensionnelle de MsbA.....	64
Figure 17 : Modèle de transport du lipide A par Eco-MsbA.....	65
Figure 18 : Modèles du mécanisme de transport des transporteurs ABC .....	66
Figure 19 : Modèle de machine à coudre de Rad50.....	68
Figure 20 : Mécanisme de régulation de la sécrétion d'insuline des cellules $\beta$ pancréatiques en fonction de la glycémie. ....	75
Figure 21 : Pourcentage d'identité et d'homologie de séquence entre SUR1 et SUR2A pour chaque domaine structural. ....	84
Figure 22 : Architecture supposée des canaux potassiques sensibles à l'ATP (K <sub>ATP</sub> ) .....	87
Figure 23 : Composition des différents canaux K <sub>ATP</sub> des tissus de mammifères .....	87
Figure 24 : Formules semi-développées de quelques bloqueurs des canaux K <sub>ATP</sub> .....	95
Figure 25 : Structures semi-développées et familles de différents ouvreurs des canaux K <sub>ATP</sub> .....	97
Figure 26: Mode opératoire simplifié d'étude des canaux K <sub>ATP</sub> sauvages, chimériques et mutants...100	
Figure 27. Vecteur d'expression ovocytaire pGEMHE .....	101
Figure 28 : Aspect des ovocytes de <i>Xénope</i> .....	102
Figure 29. Description des différentes étapes lors d'une réaction SOE.....	104
Figure 30 : Description des étapes de mutagenèse dirigée .....	106
Figure 31 : Description des étapes de la transcription <i>in vitro</i> .....	109

Figure 32 : Les différentes configurations de la technique du patch-clamp .....	111
Figure 33 : Le poste de patch clamp.....	114
Figure 34 : Photographie du système de perfusion, inséré dans la cage de Faraday.....	115
Figure 35 : Conditions expérimentales de mesures de l'activité des canaux $K_{ATP}$ par la technique de patch clamp en mode excisé inside-out. ....	116
Figure 36 : Effet des mutations simples et doubles des NBD de SUR2A sur l'action de différents ouvreurs. ....	125
Figure 37: Effet du SR47063 et du P1075 sur différents mutants de la thréonine 1253 de SUR2A. .	131
Figure 38: Effet du SR47063 et du P1075 sur différents mutants de la méthionine 1290 de SUR1..	133
Figure 39: Effet du SR47063 et du P1075 sur les mutants des résidus aromatiques de l'hélice 17 de SUR2A.....	134
Figure 40: Effet de trois ouvreurs (SR47063, P1075 et HOE234) sur les mutants de la tyrosine 1257 de SUR2A. ....	136
Figure 41 : Hélices $\alpha$ 17 de SUR2A et M1 de Kir6.2 schématisées vues de la face extracellulaire...	140
Figure 42 : Modèle Phospholipase C – Flippase pour expliquer les phénomènes de "run-down". ....	145
Figure 43 : Modèle du substrat-lié constant pour SUR1. ....	151

Les tableaux :

Tableau 1 : Concentrations ioniques à l'intérieur et à l'extérieur d'une cellule de mammifère .....	18
Tableau 2 : Description des différents gènes des canaux sodiques voltage-dépendants .....	24
Tableau 3 : Gènes, protéines et localisation chromosomique et tissulaire de différents Kir .....	42
Tableau 4 : Principales substances interagissant avec les canaux $K^+$ .....	48
Tableau 5 : Propriétés électrophysiologiques des canaux $K_{ATP}$ . ....	77

## **SIGLES ET ABREVIATIONS**

**2-5A** : oligomères de l'ATP

**4-AP** : 4-Amino Pyridine

### **A**

**ABC** : ATP Binding Cassette

**ABCP** : Placenta-specific ABC gene

**ABCR** : Retina ABC

**AChR** : ACétylcholine Receptor

**ADNc** : ADN copie

**ALD(P)** : AdrénoLeukoDystrophie (Protein)

**AMPA** :  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxazolePropriate

**AMPc** : AMP cyclique

**ARNc** : ARN copie

### **B**

**BCRP** : Breast Cancer Resistance Protein

**BK** : Maxi K<sub>Ca</sub>

**BSEP** : Bile Salt Export Pump

### **C**

**CFTR** : Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator

**Chim** : Chimère

**CLC**: Cl<sup>-</sup> Channels

**cMOAT** : canalicular Multispecific Organic Anion

**CNG** : Cyclic Nucleotide-Gated channel

**Cter** : extrémité Carboxy-terminale d'un peptide ou polypeptide

**CTX** : CharibdoToXine

**CTX** : CharybdoToXine

### **D**

**DAG** : DiAcyl-Glycérol

**DNFB** : 2-4-DiNitroFluoroBenzène

**DTX** : DenDroToxine

## E

***E. coli*** : *Escherichia coli*

**Eag** : Ether à go-go

**E<sub>Cl</sub>** : Potentiel d'équilibre des ions chlorure

**EDTA** : Ethylene Diamine Tetraacetic Acid

**EGTA** : Ethylene Glycol-*bis*(β-aminoethylether) N,N,N',N'-Tetraacetic Acid

**E<sub>K</sub>** : potentiel d'équilibre pour le potassium

## G

**GABA** : γ-AminoButyric Acid

**GluR** : Glutamate Receptor

**GMPc** : GMP cyclique

**GSH** : Glutathion réduit

**GS-X** : Glutathion lié à une autre molécule

## H

**HCNG** : Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotides-Gated channels

**HERG** : Human Eag Related Genes

**HOE234** : ouvreur potassique antihypertensif dérivé du rilimakalim

**HPLC** : High Performance Liquid Chromatography

**HVA** : High Voltage Activated

## I

**ICD** : IntraCellular Domain

**IK** : K<sub>Ca</sub> a conductance Intermédiaire

**InsP3** : Inositol 1,4,5-*tris*Phosphate

## K

**K<sub>ATP</sub>** : Canal potassique sensible à l'ATP

**K<sub>Ca</sub>** : canal potassique active par le calcium

**K<sub>i</sub>** : constante de demi-inhibition

**K<sub>ir</sub>** : K<sup>+</sup> inward rectifier channel

**K<sub>Na</sub>** : canal potassique activé par le sodium

**K<sub>v</sub>** : canal potassique voltage-dépendant

**L**

**LmrA**, *Lactococcus lactis* multidrug resistance protein A

**LTC** : Leukotriène cystéinyl

**LVA** : Low Voltage Activated

**M**

**MCDP** : peptide dégranulant les mastocytes

**MDR** : MultiDrug Resistance protein

**MRP** : Multidrug Resistance Protein

**MXR1** : Mitoxantrone Resistance associated protein

**N**

**NBD** : Nucleotide Binding Domain

**NMDA** : N-Methyl-D-Aspartate

**Nter** : extrémité amino-terminale d'un peptide ou polypeptide

**P**

**P1075** : ouvreur potassique antihypertensif dérivé du pinacidil

**PCR** : Polymerase Chain Reaction

**PDR** : Pleiotropic Drug Resistance protein

**P-gp** : P-glycoprotein

**PIP** : Phosphatidylinositol 4-Phosphate

**PIP2** : Phosphatidylinositol 4,5-*bis*Phosphate

**PIPES** : PIPerazine-N,N'-bis-[2-EthaneSulfonic acid])

**PKA** : Protéine Kinase A

**PKC** : Protéine Kinase C

**PMP** : PéroxysoMale Protein

**PSD-95** : protéine PostSynaptic Density-95

**R**

**RinsP3** : Récepteur à l'inositol 1,4,5-*tris*Phosphate

**RyR** : Ryanodin Receptor

**S**

**SA** : Stretch-Activated

**SI** : Stretch-Inactivated

**SK** :  $K_{Ca}$  à faible conductance

**SOE** : Splicing by Overlap Extension

**SR47063** : ouvreur potassique antihypertensif dérivé du cromakalim

**SUR** : SulfonylUrea Receptor

**T**

**TAP** : Transporter associated with Antigen Processing

**TEA** : TétraEthylAmmonium

**TM, TMD** : TransMembrane Domain

**V**

**VLCFA-CoA synthase** : Very Long Chain Fatty Acid – Co-enzyme A synthase

**V<sub>m</sub>** : Potentiel de membrane

**Y**

**YCF1** : Yeast Cadmium Factor

**Tableau des différentes nomenclatures des acides  $\alpha$ -aminés :**

Code Mono-lettre	Code à 3 lettres	Nom commun complet	Caractéristique de la chaîne latérale
A	Ala	Alanine	non polaire
C	Cys	Cystéine	
F	Phe	Phénylalanine	
G	Gly	Glycine	
I	Ile	Isoleucine	
L	Leu	Leucine	
M	Met	Méthionine	
P	Pro	Proline	
V	Val	Valine	
W	Trp	Tryptophane	
N	Asn	Asparagine	polaire
Q	Gln	Glutamine	
S	Ser	Sérine	
T	Thr	Thréonine	
Y	Tyr	Tyrosine	
H	His	Histidine	basique
K	Lys	Lysine	
R	Arg	Arginine	
D	Asp	Aspartate	acide
E	Glu	Glutamate	

# **INTRODUCTION**

# 1. INTRODUCTION

Depuis leur découverte en 1983 par Akinari Noma (Noma, 1983), puis le clonage des sous-unités qui les composent en 1995 et 1996 (Aguilar-Bryan et al., 1995 ; Inagaki et al., 1996 ; Inagaki et al., 1995a ; Inagaki et al., 1995b ; Sakura et al., 1995a), de nombreux travaux ont permis de mieux comprendre la structure et la fonction des canaux potassiques sensibles à l'ATP ( $K_{ATP}$ ). Ces canaux ont des rôles primordiaux dans différents tissus (pancréas, muscles lisses, muscles squelettiques, muscles cardiaques, cerveau, hypophyse, rein) et organelles (membrane interne des mitochondries), en couplant l'activité métabolique des cellules, *via* l'ATP, au potentiel de membrane. Aussi sont-ils une cible thérapeutique très importante pour le traitement des pathologies liées à la dérégulation de la sécrétion d'insuline, à la protection du myocarde cardiaque durant les ischémies, ou encore pour minimiser les conséquences de l'hypertension sur le système vasculaire, et plus généralement pour la lutte contre les pathologies liées au stress (Terzic et Vivaudou, 2001). Par conséquent, les agents pharmacologiques ciblant spécifiquement un type cellulaire comme les cellules  $\beta$  pancréatiques, mais n'ayant aucune action (effet secondaire) sur les canaux  $K_{ATP}$  des autres tissus tel que le myocarde, sont très recherchés.

Il reste néanmoins beaucoup à faire pour dévoiler les mécanismes par lesquels les régulateurs endogènes ou pharmacologiques agissent sur l'ouverture ou la fermeture du canal. Afin d'élucider la complexité des systèmes de régulation de ce canal, la première étape consiste à localiser le site d'interaction des molécules à forts potentiels thérapeutiques, et dans le cas de cette thèse, nous nous sommes focalisés sur la recherche du site de fixation des ouvreurs potassiques qui sont des agents hyperglycémiantes hypo-insulinémiques et/ou antihypertensifs.

Les travaux qui seront présentés dans ce mémoire sont regroupés en deux parties : le premier chapitre concernera les études d'interactions entre les ligands endogènes (MgATP, MgADP) et les ouvreurs potassiques, tandis que le deuxième chapitre se focalisera principalement sur la localisation des régions du récepteur des sulfonylurées, importantes pour l'action des ouvreurs.

Mais avant d'exposer plus précisément ces résultats, une introduction du sujet s'impose. Cette introduction sera divisée en trois parties : 1) une description succincte des canaux ioniques et plus précisément des canaux potassiques

rectifiants entrants ; 2) une présentation générale des transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) humains ; 3) une description des canaux  $K_{ATP}$ .

Dernier point avant de débiter la présentation des canaux ioniques : on peut s'interroger- sur le choix d'étudier ce canal plutôt que d'autres tout aussi importants. La raison originelle est historique, . En effet, lors de mesures de courants sur des fibres musculaires squelettiques de *Xénope*, l'équipe de Michel Vivaudou a mis en évidence en 1991 (Vivaudou et al., 1991), la présence de canaux ayant des propriétés proches de celles décrites par Spruce et al. en 1985 pour les canaux  $K_{ATP}$  du muscle squelettique. Les expériences se sont alors succédées sur les canaux  $K_{ATP}$  natifs des fibres musculaires squelettiques, mettant en évidence le rôle du magnésium et de l'ADP (Forestier et Vivaudou, 1993a), des protons sur l'effet des ouvreurs potassiques et sur la régulation du canal avec les nucléotides (Forestier et al., 1993 ; Vivaudou et Forestier, 1995 ; Forestier et al., 1996), ainsi que sur l'effet activateur et inhibiteur dose-dépendant du bisG-10 sur les canaux  $K_{ATP}$  de muscle squelettique de souris et de grenouille (Allard et al., 1995). Tout naturellement, après le clonage des sous-unités des canaux  $K_{ATP}$  en 1995, les expériences prirent une nouvelle orientation en 1997 en utilisant l'expression hétérologue des canaux  $K_{ATP}$  dans les ovocytes de *Xénope*, afin de caractériser des canaux de type sauvage, chimérique ou mutant comme cela est décrit tout au long de ce mémoire.

## 2. LES CANAUX IONIQUES

### 2.1. Introduction

Les cellules et organelles sont délimités par des membranes biologiques composées principalement de diacylphosphoglycérines (phospholipides), de diacylglycoglycérines (glycolipides), de sphingolipides et de stérols. Tous, mis à part les stérols et dérivés, ont une tête polaire et de longues chaînes hydrophobes (généralement de C12 à C24) qui forment la bicouche lipidique en fuyant les milieux aqueux. Malgré la forte diffusion et fluidité de ces lipides membranaires dans les feuillettes, le centre hydrophobe de la bicouche bloque très efficacement le passage des ions inorganiques ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$ ,  $Ca^{2+}$ , ...) et freine considérablement la diffusion des solutés organiques polaires (oses, acides aminés, ...). Seuls les solutés ayant un caractère très hydrophobe diffusent librement à travers la membrane (Shechter, 1997).

Pour survivre, la cellule doit échanger différents solutés ou ions avec l'extérieur. La diffusion simple n'étant pas possible pour tous les composés, la cellule a recours à des protéines pour assurer leur passage. Deux types de transports existent alors, le transport actif et le transport passif facilité. Dans les deux cas le gradient électrochimique joue un rôle fondamental. Il est dû à l'asymétrie des concentrations des différents solutés, la composition ionique de cellules de mammifères en est un excellent exemple (cf Tableau 1).

Ion	Concentration intracellulaire (mM)	Concentration extracellulaire (mM)
$Na^+$	5-15	145
$K^+$	140	5
$Mg^{2+}$	30	1-2
$Ca^{2+}$	1-2	2,5-5
$H^+$	$5 \times 10^{-7}$	$5 \times 10^{-7}$
$Cl^-$	4	110

**Tableau 1** : Concentrations ioniques à l'intérieur et à l'extérieur d'une cellule de mammifère (Rawn, 1990)

Les systèmes de transport actif font transiter les substrats contre leur gradient électrochimique ce qui nécessite beaucoup d'énergie pour peu de molécules transportées (1 à 1000 ions/sec). Cette énergie est apportée de 2 façon différentes : (i) par couplage chimioosmotique (ATPase) ou (ii) par couplage osmotique (symport, antiport).

Dans le cas du transport facilité, l'énergie est au contraire apportée par le gradient électrochimique, et par le potentiel de membrane, dans le cas du transport de solutés chargés. La régulation du passage se fait uniquement par ouverture ou fermeture de la ou des porte(s) qui obstrue(nt) le pore. Le flux est alors beaucoup plus élevé ( $10^6$ - $10^8$  ions/sec).

Les canaux ioniques appartiennent à cette dernière catégorie de "transporteur". Ils constituent une famille de protéines extrêmement diverses, tant sur le plan de leur structure, que de leur régulation ou de leur rôle physiologique. L'unique critère commun est leur capacité à laisser des ions traverser une membrane lipidique à travers leur pore. Cependant, ils peuvent être regroupés en sous-familles selon leur **sélectivité ionique** (calcique, sodique, potassique, chlorure), selon leur **mécanisme de régulation** (activation ou inhibition, voltage dépendance, calcium-dépendance, couplage aux protéines G, mécanosensibilité...), selon leur **profil électrophysiologique** (rectification ou non, temps d'activation et d'inactivation, sens du courant : entrant ou sortant, la conductance unitaire, la valeur seuil de la dépolarisation ou de l'hyperpolarisation...), selon leur **localisation** (canaux de la membrane plasmique ou canaux endocellulaires), selon **l'organisme** qui l'exprime (eucaryotes, procaryotes, mammifères, plantes...), selon leur **pharmacologie** (sensibilités à différents bloqueurs ou activateurs, à différentes toxines, à différents ions très proches de la nature de l'ion perméant qui transite le plus couramment à travers le canal...), ou encore selon leur **homologie de séquence** (Kv1.1-1.8...). Tous ces critères permettent de classifier efficacement les canaux.

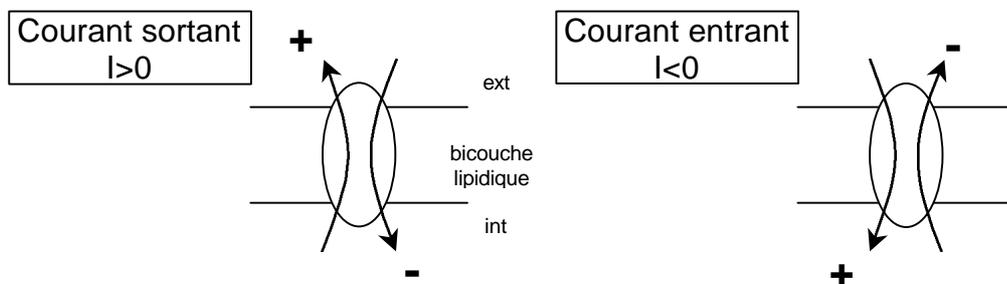
Le rôle de ces canaux est de deux natures : i) modifier le potentiel membranaire par activation ou inhibition du canal (cas typique du canal  $K_{ATP}$ ) ; ii) permettre l'entrée ou la sortie d'ions qui auront un rôle secondaire (cas typique des ions  $Ca^{2+}$  ou des ions  $Na^+$  et  $K^+$  pour le contrôle de la pression osmotique ou encore des ions  $Cl^-$  pour la sécrétion épithéliale). Ils sont ubiquitaires mais sont principalement localisés dans les cellules excitables dans lesquelles ils ont des fonctions primordiales.

## 2.2. Lois et définitions en électrophysiologie

Avant toute présentation des différents canaux ioniques, quelques précisions sur les lois électrophysiologiques s'imposent, à commencer par une définition de la sélectivité ionique.

**La sélectivité ionique** est due d'une part à la taille du pore proprement dit qui empêche toute entrée d'ions trop "gros", et d'autre part aux liaisons spécifiques entre les atomes pointant dans la lumière du pore et les ions perméants. Ainsi un pore de taille bien précise et de structure très rigide au niveau du filtre de sélectivité, combiné à des interactions électrostatiques avec les ions, permet une déshydratation efficace de l'ion qui pourra alors traverser le filtre de sélectivité. Cette déshydratation obligatoire des ions perméants explique la faible perméabilité des canaux potassiques vis-à-vis des ions  $\text{Na}^+$ , pourtant plus petits que les ions  $\text{K}^+$ , mais sa déshydratation dans le filtre des canaux potassiques est énergétiquement peu favorable contrairement aux ions potassiques.

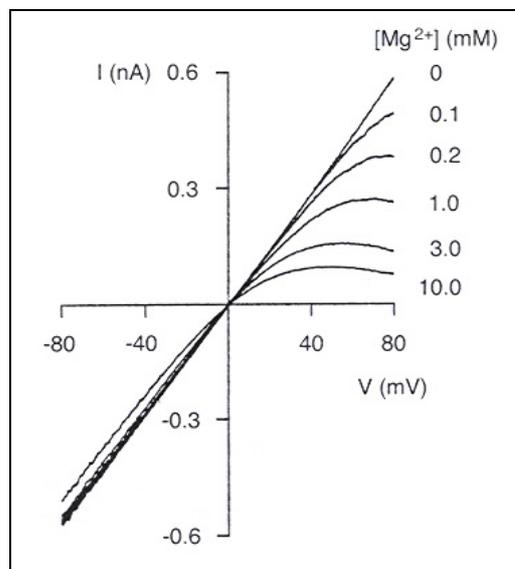
Autre précision importante en électrophysiologie, le **signe conventionnel du courant**. Celui-ci est défini de la façon suivante : Un courant sortant de la cellule (correspondant à un efflux de cations ou un influx d'anions) est positif et un courant entrant dans la cellule (correspondant à un influx de cations ou un efflux d'anions) est négatif.



Un courant entrant est **dépolarisant** et réciproquement, un courant sortant est **hyperpolarisant**.

Certains canaux sont "**rectifiants**" soit entrant soit sortant. Une rectification correspond à une variation non linéaire de l'intensité du courant en fonction d'une certaine gamme de tension imposée. En effet, la relation entre le courant et la tension est normalement linéaire dans les conditions simples de la loi d'Ohm, cependant un canal ne se comporte pas toujours comme une résistance simple, car d'autres facteurs interviennent. Ces facteurs sont le plus souvent d'autres ions non perméants qui encombreront le passage d'autant plus fortement que le potentiel

imposé les y conduit. De plus, ce blocage est localisé du côté où l'ion imperméant est le plus fortement concentré ou peut le mieux se lier au canal, expliquant que la rectification ne soit que dans un sens (Figure 1).



**Figure 1** : Rectification dose-dépendante de Kir1.1 due au magnésium intracellulaire (Ashcroft, 2000).

Seul les courants sortants sont affectés par des concentrations croissantes de  $Mg^{2+}$ . Ces résultats ont été obtenus en conditions symétriques de potassium à 100mM (Lu et MacKinnon, 1994).

La définition littérale de la rectification entrante est : "une rectification est entrante lorsque le courant entrant augmente plus que le gradient électrochimique ou lorsque le courant sortant diminue avec l'augmentation du gradient électrochimique, et réciproquement". Matsuda et al., 1987 et Vandenberg, 1987, ont montré que la rectification entrante des canaux Kir était due aux ions  $Mg^{2+}$ . C'est le cas pour Kir1.1 et Kir6.2.

Si le potentiel électrochimique (potentiel de membrane et/ou différence de concentration) d'un ion est différent entre la partie externe et interne d'une membrane, le transport de l'ion se fera par diffusion facilitée à travers le canal, générant un courant qui obéit à la **loi d'Ohm** :

$$U=RI \quad U : \text{potentiel} \quad R : \text{résistance} \quad I : \text{intensité}$$

R : résistance du patch

$$\frac{1}{R}=N\left(\frac{1}{r}\right)$$

N : nombre de canaux

r : résistance d'un seul canal

Le sens du courant dépend alors du potentiel de membrane vis à vis du potentiel d'équilibre de l'ion (**potentiel de Nernst**) :

$$V_s = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[S_e]}{[S_i]}$$

$V_s$  (potentiel d'équilibre d'un ion S)  
 $R$  (constante des gaz parfaits) = 8.315 J/K/mol  
 $T$  (température en K) = 273 + t (°C)  
 $z$  (valence de l'ion)  
 $F$  (constante de Faraday) = 96 500 C/mol  
 $S_e, S_i$  (concentration de l'ion S, respectivement extracellulaire et intracellulaire)

Ce potentiel d'équilibre dépend donc de la température, mais surtout du rapport des concentrations intra- et extracellulaires des ions.

Dans le cas des ions potassiques, et suivant les concentrations énumérées dans le Tableau 1, le potentiel d'équilibre à 37°C est de -89mV, tandis que le potentiel de membrane à l'équilibre d'une cellule de mammifère standard est d'environ -80mV. Ces deux potentiels sont proches car les membranes des cellules de mammifères comportent de nombreux canaux perméables au potassium. Dans ces conditions physiologiques, les ions  $K^+$  diffuseront passivement vers l'extérieur dès l'ouverture des canaux potassiques, créant un courant sortant.

L'intensité du courant dépend également de plusieurs facteurs : la perméabilité du canal pour l'ion, sa valence, le potentiel de membrane, la température et bien sûr les concentrations ioniques de part et d'autre de la membrane. Tous ces paramètres sont retranscrits dans **l'équation de Goldman-Hodgkin-Katz** (GHK) :

$$I_s = P_s z_s^2 \left( \frac{VF^2}{RT} \right) \frac{[S_i] - [S_e] \exp\left(\frac{-z_s FV}{RT}\right)}{1 - \exp\left(\frac{-z_s FV}{RT}\right)}$$

$I_s$  : courant généré par le transit de l'ion S  
 $P_s$  : perméabilité du canal pour l'ion S  
 $[S]$  : concentration intra- (i) et extracellulaire (e)  
 $z, R, T$  et  $F$  : constantes physiques habituelles

Ces équations, et bien d'autres plus compliquées encore, ont permis une meilleure compréhension des phénomènes électriques observés dans les cellules, ainsi qu'une optimisation des techniques électrophysiologiques permettant de distinguer et de caractériser les très nombreux et divers types de canaux ioniques comme cela est présenté dans le chapitre suivant.

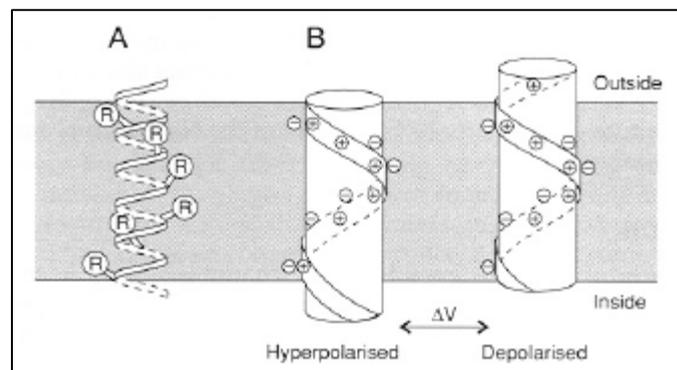
### 2.3. La famille des canaux ioniques

Ces définitions de base en électrophysiologie étant posées, les paragraphes suivants auront pour objectif de ne donner qu'une vision globale de cette grande famille que sont les canaux ioniques. Cette vision est nécessaire pour bien comprendre leurs interactions dans le contrôle de l'activité électrique cellulaire. Seul

le chapitre sur les canaux potassiques rectifiants entrants sera plus étoffé, puisque les canaux  $K_{ATP}$  appartiennent à cette sous-famille.

### 2.3.1. Les canaux activés par le potentiel

Comme leur nom l'indique, ces canaux sont activés lors d'un changement du potentiel de membrane. La sonde moléculaire (voltage sensor) des canaux sensibles au voltage est l'hélice transmembranaire S4 qui comprend de nombreux résidus basiques (Arg, Lys) ayant des chaînes latérales chargées positivement et répartis sur toute la longueur d'une face de l'hélice  $\alpha$ . L'hyperpolarisation ou la dépolarisation provoque une modification du champ électrique transmembranaire modifiant la position de l'hélice S4 respectivement vers l'intérieur ou l'extérieur de la cellule (Figure 2).



**Figure 2** : Déplacement de l'hélice S4 (voltage-sensor) en fonction de la variation du potentiel de membrane (Ashcroft, 2000).

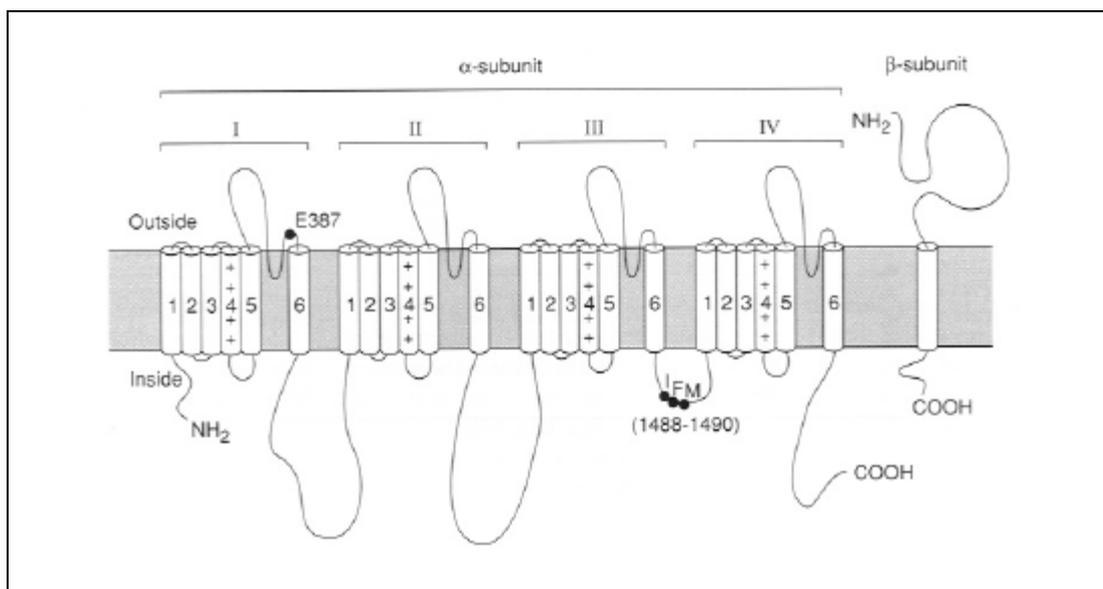
**A)** Orientation des chaînes latérales dans une hélice  $\alpha$  transmembranaire. **B)** Suivant la dépolarisation ou l'hyperpolarisation de la membrane, l'hélice S4 se déplace dans la membrane grâce aux nombreuses charges positives présentes dans cette hélice. Ces modifications conformationnelles ouvrent ou ferment la porte du canal.

Ce mécanisme d'activation et d'inhibition est commun aux canaux voltage-dépendants de diverses spécificités ioniques (sodiques, calciques, potassiques) présentés ci-dessous.

#### 2.3.1.1. Les canaux $Na^+$

Noda et al. ont cloné le premier canal sodique en 1984. Il est constitué de 2 sous-unités :  $\alpha$  et  $\beta$ . La sous-unité  $\alpha$  est la plus grosse (~2000 résidus) avec 4 domaines transmembranaires (I-IV) composés chacun de 6 hélices  $\alpha$  (S1-S6) qui forment le pore proprement dit du canal. La sous-unité  $\beta$  est beaucoup plus petite puisqu'elle ne

comprend qu'une seule hélice transmembranaire et un poids de 26 kDa lorsqu'elle est glycosylée.



**Figure 3** : Prédiction de structure des canaux  $\text{Na}^+$  voltage dépendants (Ashcroft, 2000).

Les résidus mentionnés correspondent pour E387 à une implication dans la fixation de la tetrodotoxine ; et pour IFM 1488-1490 à une partie de la porte d'inactivation.

La sous-unité principale ( $\alpha$ ) est généralement associée à une ou plusieurs sous-unités  $\beta$  qui augmente(nt) l'amplitude du courant sodique et modifie(nt) les propriétés du canal vis-à-vis du profil d'inactivation par exemple (Isom et al., 1992 ; Ji et al., 1996).

Différentes isoformes existent (Tableau 2) :

Gène	Protéine	Chromosome (humain)	Localisation prédominante	Référence
SCN1A	$\alpha 1$	2q24	cerveau et moelle épinière	Malo et al., 1994
SCN2A	$\alpha 2$	2q23-q24.3	cerveau et moelle épinière	Litt et al., 1989
SCN3A	$\alpha 3$	2q24-q31	cerveau et moelle épinière	Malo et al., 1994
SCN4A	$\alpha 4$	17q23-q25	muscle squelettique	George et al., 1991
SCN5A	$\alpha 5$	3p21	muscle cardiaque	George et al., 1995
SCN6A	$\alpha 6$	2q21-q23	cœur et utérus	Han et al., 1991
SCN7A	$\alpha 7$	--	Cellules gliales	Potts et al., 1993
SCN8A	$\alpha 8$	12q13	cerveau et moelle épinière	Burgess et al., 1995
SCN1B	$\beta 1$	19q13.1		Makita et al., 1994a,b
SCN2B	$\beta 2$	11q23 (?)		Bolino et al., 1998

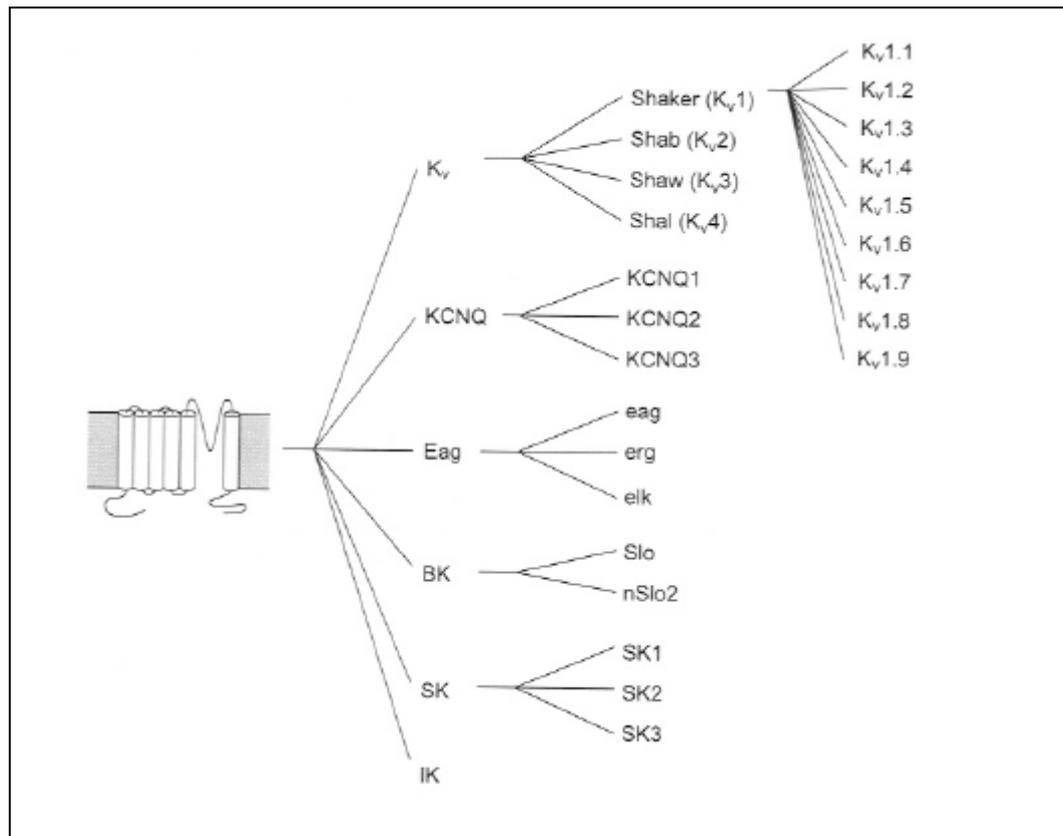
**Tableau 2** : Description des différents gènes des canaux sodiques voltage-dépendants (Ashcroft, 2000)

Les canaux sodiques voltage-dépendants sont responsables de la phase montante des potentiels d'action des cellules nerveuses et des fibres musculaires.

Les gènes de ces sous-unités sont exprimés de façon différentielle suivant le type tissulaire et suivant le stade du développement de l'organisme. Des mutations dans ces différents canaux sont responsables de maladies telles que la paralysie périodique hyperkalémique (augmentation excessive du potassium sanguin), la paramyotonie congénitale et la myotonie aggravée par le potassium, la paralysie périodique chez le cheval, le syndrome de Long QT dans le cœur, les crises d'épilepsie avec fièvre.

#### 2.3.1.2. Les canaux K<sup>+</sup>

Les canaux potassiques ont été trouvés dans quasiment toutes les cellules. Les polypeptides formant ces canaux sont bien plus petits que ceux des canaux calciques ou sodiques. Ils forment des complexes homo- ou hétéromultimériques de taille et de structure très proches des autres canaux. Grâce à la multiplicité des gènes codant pour ces canaux potassiques voltage-dépendants, aux épissages alternatifs de certains de ces gènes, à la possibilité de créer différentes associations dans le complexe multimérique, aux modulations par des modifications post-traductionnelles (glycosylation, phosphorylation), à l'existence de sous-unités  $\beta$  modulatrices, à la modulation des propriétés biophysiques et pharmacologiques par l'environnement lipidique, il existe une grande variété de canaux voltage-dépendants (Figure 4).



**Figure 4** : Les différents types de canaux potassiques voltage-dépendants (Ashcroft, 2000)

Les 6 familles de canaux présentées dans la figure, peuvent être regroupées en 3 groupes :

1. les canaux potassiques activés par dépolarisation, type A (Kv)
2. les canaux potassiques rectifiants retardés activés par dépolarisation (KCNQ, Eag)
3. les canaux potassiques activés par le calcium (BK, IK, SK)

### **2.3.1.2.1. Les canaux Kv**

Le premier canal potassique voltage-dépendant fut découvert chez *drosophila melanogaster* lors du comptage et de la détermination du genre sexuel de ces mouches du vinaigre. En effet, en anesthésiant ces insectes avec de l'éther, ceux-ci se mettaient à trembler à cause de l'activité du canal potassique voltage-dépendant nommé "Shaker" (Papazian et al., 1987). Depuis, d'autres canaux potassiques voltage-dépendants ont été découverts en utilisant des sondes issues du gène *shaker*. Il s'agit des canaux Shab, Shaw et Shal, très homologues en séquence, mais ayant des cinétiques d'activation et d'inhibition très différentes. De plus, de

nombreuses isoformes de chacun de ces canaux ont également été découvertes, et répertoriées selon la nomenclature suivante :

Kv1.1-Kv1.8 : Canaux homologues au Shaker : activés par dépolarisation, mais inactivation rapide (type A).

Kv2.1-Kv2.2 : Canaux homologues à Shab : cinétique d'inactivation intermédiaire.

Kv3.1-Kv3.4 : Canaux homologues à Shaw : pas d'activation observée (type retardé)

Kv4.1-Kv4.3 : Canaux homologues à Shal : cinétique d'inactivation intermédiaire

Leur structure et leurs fonctions sont très homologues aux canaux sodiques sensibles au potentiel. Comme eux, les canaux Kv sont constitués d'une sous-unité  $\alpha$ , mais correspondant à un seul domaine transmembranaire de canaux  $\text{Na}^+$ . Dans l'un et l'autre cas, l'hélice S4 est richement chargée en résidus basiques. Comme eux, certains canaux Kv sont associés à une petite sous-unité  $\beta$ .

Les différences se situent dans (i) la possibilité de former des complexes hétéromultimériques, (ii) la présence d'une petite hélice  $\alpha$  H5 qui forme le filtre de sélectivité aux ions potassiques, et (iii) la présence en Nter d'un domaine cytoplasmique T (tétramérisation) qui est impliqué à la fois dans l'oligomérisation et l'interaction avec la sous-unité  $\beta$ .

Leur mécanisme d'activation est identique à celui des canaux sodiques voltage-dépendants. Le mouvement de l'hélice S4 en fonction du potentiel provoque un changement conformationnel qui active ou inhibe le canal. Cependant, les canaux Kv ont deux mécanismes d'inactivation, un rapide et un lent.

Le type N correspond, pour les canaux de type Shaker, à une inactivation rapide des canaux Kv par occlusion de la voie d'entrée interne du pore à l'aide d'une "boule" de résidus chargés positivement en Nter (type N).

L'inactivation de type C (Cter) est moins bien comprise. Elle ferait intervenir des éléments présents sur la face externe du canal. Il s'agirait d'un changement conformationnel du canal qui réduirait la taille de l'entrée externe (Liu et al., 1996).

L'activité de certains canaux Kv est modulée par phosphorylation. C'est le cas de Kv3.4 dont la phosphorylation de la "boule" Nter par la Protéine Kinase C (PKC) empêche l'inactivation de type N.

La maladie connue pour être liée à ces canaux est une maladie neurologique affectant le système nerveux central et périphérique, l'ataxie (mauvaise coordination des mouvements) épisodique de type 1.

### **2.3.1.2.2. Les canaux KCNQ**

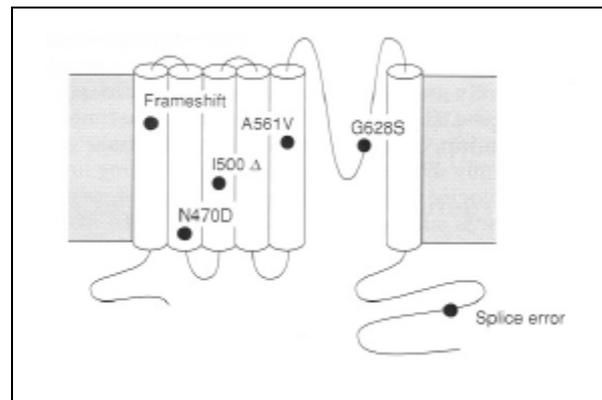
Cinq membres composent cette famille dont le plus connu est KCNQ1 (KvLQT1) qui est impliqué dans le syndrome de QT long (LQT1).

KCNQ1 est la sous-unité majeure des canaux  $I_{KS}$  cardiaques qui interviennent dans la repolarisation du potentiel d'action ventriculaire. KCNQ1, exprimé de façon hétérologue, génère un courant potassique sortant voltage-dépendant qui ne retrouve ses propriétés natives qu'en présence d'un petit peptide de 130 résidus, MinK ( $I_{sK}$ ). Ce petit peptide jouant le rôle de sous-unité  $\beta$  n'a qu'une seule hélice transmembranaire. Ces canaux sont principalement exprimés dans le cœur et à un taux plus faible dans le pancréas, les reins, les poumons, le placenta et les oreilles.

KCNQ2 et KCNQ3 sont largement présents dans différentes parties du cerveau. Leur structure est identiques à celle des canaux Kv. Leur canalopathie se situe principalement au niveau du syndrome de QT long, ainsi que dans la surdité et l'épilepsie néonatale familiale bénigne.

### **2.3.1.2.3. Les canaux $K^+$ de type Eag (HERG)**

Eag signifie "Ether à go-go" en rapport aux go-go dancings des années 60. En effet, lorsqu'il a été découvert que certaines drosophiles mutantes endormies à l'éther remuaient leurs pattes dans tous les sens, les chercheurs ont donné ce nom de *eag* aux canaux  $K^+$  responsables de cette frénésie. Depuis, 2 autres gènes ont été clonés : *erg* et *elk*. Les canaux humains HERG (Human Eag Related Genes) n'ont que 49% d'identité de séquence avec ces canaux et appartiennent donc très certainement à une autre famille de gènes proches de *eag*. Les canaux HERG sont fortement exprimés dans le cœur, suggérant une implication dans la repolarisation du potentiel d'action cardiaque. Cette hypothèse a été confirmée par l'implication de mutants de HERG dans le syndrome de QT long (LQT2). Leur structure est identique à celle des canaux Kv avec l'hélice S4 comme voltage-sensor (Figure 5).



**Figure 5** : Prédiction de structure des canaux HERG et les mutations associées à LQT2 (Ashcroft, 2000)

Les seules différences sont, premièrement la séquence signature des canaux potassiques qui est GFG et non GYG, et deuxièmement la présence dans la partie proximale du Cter d'un domaine homologue au domaine de fixation des nucléotides cycliques. Cependant ceux-ci n'ont pas d'effet sur les courants HERG exprimés dans les ovocytes de *Xénope*. Ces courants sont sortants et observables après dépolarisation de potentiels supérieurs à  $-50\text{mV}$ . L'amplitude du courant varie en fonction du potentiel de membrane, l'amplitude maximale étant atteinte à  $0\text{mV}$ . Les canaux HERG constituent une partie des canaux  $I_{\text{KR}}$  cardiaques (courant rectifiant retardé) (Sanguinetti et al., 1995).

En plus de l'implication de HERG dans la forme la moins courante du syndrome de QT long (LQT2), le gène *eag* est impliqué dans la suppression de l'excitabilité neuronale. Transposées chez l'homme (HERG), ces mutations provoquent une hyperactivité ou une paralysie en fonction de la température. Une autre maladie liée à ces canaux, la "torsade de pointes" correspond à une arythmie cardiaque qui peut être fatale (forme de fibrillation ventriculaire).

### 2.3.1.3. Les canaux $\text{Ca}^{2+}$

Ils jouent des rôles cruciaux dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires : initiation de la contraction musculaire, déclenchement du relargage de neurotransmetteurs du système nerveux central et d'hormones de cellules sécrétrices, régulation de l'expression de certains gènes et du cycle cellulaire, et intervention dans la mort cellulaire.

La concentration cytosolique de calcium est très faible comparée aux concentrations externes (Tableau 1), et peut être ainsi modifiée rapidement par tous

les mouvements transmembranaires de calcium. La régulation des quantités de calcium intracellulaire est due, entre autres, aux canaux voltage-dépendants, mais également aux canaux calciques "ligand-gated" et aux canaux endocellulaires contrôlant la sortie du calcium des stocks très importants du réticulum endo- ou sarcoplasmique.

Il existe de nombreux types de canaux calciques voltage-dépendants. Ils sont classés sous les abréviations T, L, N, P, Q et R en fonction de leur sensibilité aux bloqueurs pharmacologiques, de leur conductance unitaire, de leur cinétique et de leur dépendance au voltage (Ashcroft, 2000).

Deux grands groupes de canaux se dégagent suivant leur dépendance au seuil de dépolarisation membranaire nécessaire à leur activation.

- Les canaux bas seuil (**LVA** : Low Voltage Activated) contenant les canaux de type **T** (Transient) qui s'activent à des potentiels relativement négatifs (-50, -30mV) et s'inactivent très rapidement. Ils sont impliqués dans la genèse d'activités électriques spontanées et répétitives.
- Les canaux à haut seuil (**HVA** : High Voltage Activated) dont les autres canaux calciques voltage-dépendants font partie (L, N, P, Q, R). Ils nécessitent une plus forte dépolarisation pour être activés.

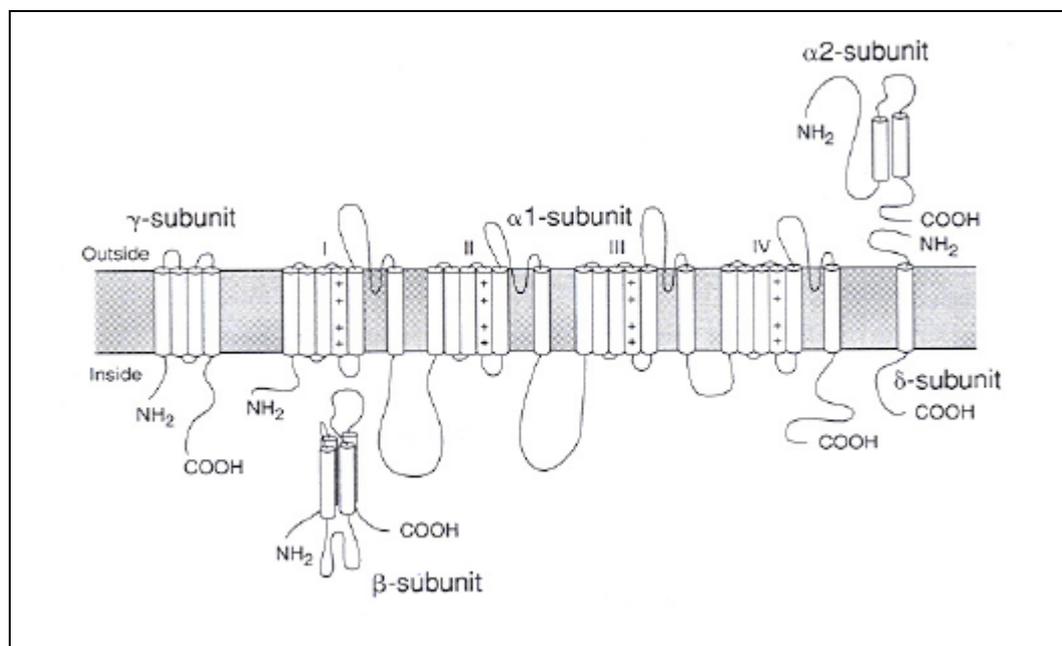
Les différents sous-types des canaux HVA sont ensuite séparés selon leur profil pharmacologique (Ashcroft, 2000 ; Dubois, 1999) :

- Les canaux de type **L** (Long Lasting) sont bloqués par les dihydropyridines. Ils s'inactivent très lentement et sont généralement plus perméables au strontium et baryum qu'au calcium. Ce courant lent, originellement décrit dans les muscles, joue un rôle majeur dans le couplage excitation-contraction ou excitation-sécrétion.
- Les canaux de type **N** (Non T, Non L, Neuronal) sont pour leur part bloqués par deux toxines du coquillage *Conus geographus* :  $\omega$ -conotoxine GIVA et  $\omega$ -conotoxine MVIIA
- Les canaux de type **P** (présents dans les cellules de Purkinje) sont bloqués par la toxine  $\omega$ -agatoxine IVA d'*Agelenopsis aperta*.
- Les canaux de type **Q** (juste après P) sont également bloqués par la toxine  $\omega$ -agatoxine IVA mais avec une affinité moindre.

- Les canaux de type **R** (juste après Q) ont été trouvés par clonage et non selon leur profil pharmacologique.

Leur régulation est très complexe et due à un grand nombre de modulateurs cytosoliques dont les plus importants sont les protéines fixant le GTP (protéines G) et les protéines kinases.

Leur structure est très complexe puisqu'elle comprend 5 sous-unités  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$  en stœchiométrie 1:1:1:1:1. Cependant, la sous-unité  $\alpha_1$  a une structure homologue à celle des canaux sodiques avec 4 domaines (I-IV), comprenant chacun 6 hélices  $\alpha$  dont le voltage-sensor (S4). Comme indiqué sur la Figure 6, les autres sous-unités se fixent autour, soit *via* la membrane ( $\delta$  et  $\gamma$ ), soit sur la face intracellulaire ( $\beta$ ), soit sur la face externe ( $\alpha_2$ ), chacune ayant des poids moléculaires bien distincts : 190kDa ( $\alpha_1$ ), 160 kDa ( $\alpha_2$ ,  $\delta$ ), 52 kDa ( $\beta$ ) et 32 kDa ( $\gamma$ ).  $\alpha_2$  et  $\delta$  sont issues de la protéolyse d'une pro-protéine issue du même gène. Ces sous-unités ont des rôles auxiliaires tels que l'augmentation de l'amplitude du courant, des effets sur les propriétés cinétiques et dans quelques cas, elles confèrent la sensibilité à des molécules régulatrices.



**Figure 6** : Prédiction de structure des différentes sous-unités des canaux calciques voltage-dépendants (Ashcroft, 2000)

Sept gènes différents codent pour les sous-unités  $\alpha_1$ .  $\alpha_{1G}$  se retrouve dans les canaux de type T ;  $\alpha_{1S}$ ,  $\alpha_{1C}$ ,  $\alpha_{1D}$  dans les canaux de type L ;  $\alpha_{1D}$  dans les canaux de

type N ;  $\alpha_{1A}$  dans les canaux de type P et Q ; et  $\alpha_{1E}$  probablement dans les canaux de type R.

A la vue de ce complexe multimérique, il n'est pas surprenant de constater que les interactions protéine-protéine dans ce canal sont très importantes. La plus importante est l'interaction entre les sous-unités  $\alpha$  (six différents sous-types) et les 4 sous-types de sous-unités  $\beta$  actuellement clonées. Ces interactions augmentent de façon non négligeable l'amplitude du courant et/ou ses cinétiques. Les études de Pragnell et al., 1994, ont montré que la sous-unité  $\beta$  se fixait dans la région cytoplasmique entre I et II et c'est dans cette même région qu'interagissent les sous-unités  $\alpha_1$  avec les protéines G (De Waard et al., 1997).

Sur le plan pharmacologique, il existe 3 bloqueurs principaux : les phénylalkylamines, les benz(othi)azipines et les dihydropyridines. Ces composés sont connus pour se fixer sur 3 sites distincts de la sous-unités  $\alpha_1$  et sont liés de façon allostérique. La localisation de ces sites par mutagenèse dirigée a permis de définir les régions TM5 et TM6 de II et TM6 de IV.

Les pathologies liées aux mutations des canaux calciques voltage-dépendants, sont très nombreuses, telles que la dysgenèse musculaire chez la souris, la paralysie périodique hypokalémique, l'hyperthermie maligne, l'ataxie épisodique de type 2, la migraine hémiplégique familiale, l'ataxie spinocérébrale de type 6 et bien d'autres encore, justifiant les nombreuses recherches sur ces canaux.

#### 2.3.1.4. Les canaux $Cl^-$

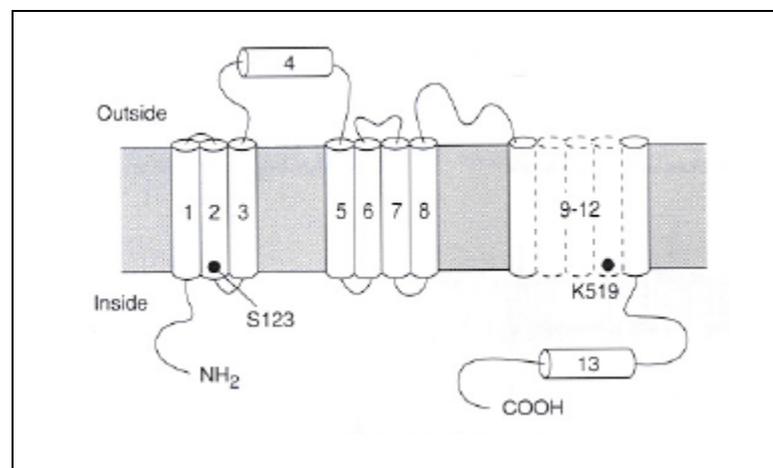
Les canaux chlorure sont importants pour le contrôle de l'excitabilité membranaire, le transport transépithélial et la régulation du volume cellulaire et du pH intracellulaire. On les retrouve également au niveau des membranes des organelles dans lesquelles les canaux chlorure voltage-dépendants sont importants pour créer une voie électrique dérivée (shunt) qui facilite l'acidification intra-organelle.

Depuis le clonage du premier canal chlorure voltage-dépendant CLC-0 de la torpille électrique *Torpedo marmorata* en 1990 (Jentsch et al., 1990), 9 canaux  $Cl^-$  de mammifères ont été clonés : de CLC-1 à CLC-7, CLC-Ka et CLC-Kb. Ils sont regroupés en 3 sous-groupes principaux : (i) CLC-1, CLC-2 et les CLC-K ; (ii) CLC-3 à CLC-5 ; et (iii) CLC-6 et CLC-7.

CLC-1 est localisé principalement dans les muscles squelettiques des mammifères où ils jouent un rôle important dans l'excitabilité musculaire. CLC-2,

CLC-6 et CLC-7 sont exprimés de façon ubiquitaire, tandis que CLC-3 et CLC-4 ont une distribution tissulaire très large, et plus précisément dans le cerveau, le cœur, les poumons et le rein pour CLC-3, et dans les muscles squelettiques, le cerveau et le cœur pour CLC-4. CLC-5 et les CLC-K sont majoritaires dans le rein où ils sont impliqués dans le transport transépithélial des ions chlorure. A noter que CLC-2 est activé par le gonflement du volume cellulaire (cell swelling).

Leur poids moléculaire varie entre 75 et 130 kDa (650 à 1000 résidus). Leur profil d'hydrophobicité a permis de prédire une structure à 13 hélices  $\alpha$  (Figure 7). Les hélices de 1 à 3, de 5 à 8 et de 9 à 12 sont transmembranaires (la zone 9 à 12 n'est pas très bien définie dans le nombre et la position des hélices). L'hélice 4 est extracellulaire et l'hélice 13 est cytosolique.



**Figure 7** : Prédiction de structure des canaux chlorure voltage-dépendants (Ashcroft, 2000)

S123 est extrêmement conservée entre tous les CLC, sa mutation réduit la sélectivité ionique et la conductance unitaire, tout comme K519. Ces canaux se dimériseraient et formeraient deux pores distincts.

Cette structure est réellement très différente des structures des autres canaux ioniques voltage-dépendants.

Les différentes maladies liées à un dysfonctionnement des canaux CLC sont : la myotonie congénitale et généralisée ; la néphrolithiase et le syndrome de Batter de type III.

## 2.3.2. Les canaux activés par les ions

### 2.3.2.1. $K_{Ca}$

Les canaux  $K_{Ca}$  sont des canaux potassiques activés par une augmentation du calcium intracellulaire. Ils sont présents dans la plupart des cellules nerveuses où ils

jouent un rôle majeur dans le contrôle des potentiels d'action et dans la régulation de l'excitabilité cellulaire.

Suivant leurs propriétés électrophysiologiques, les canaux  $K_{Ca}$  sont classés en 3 groupes :

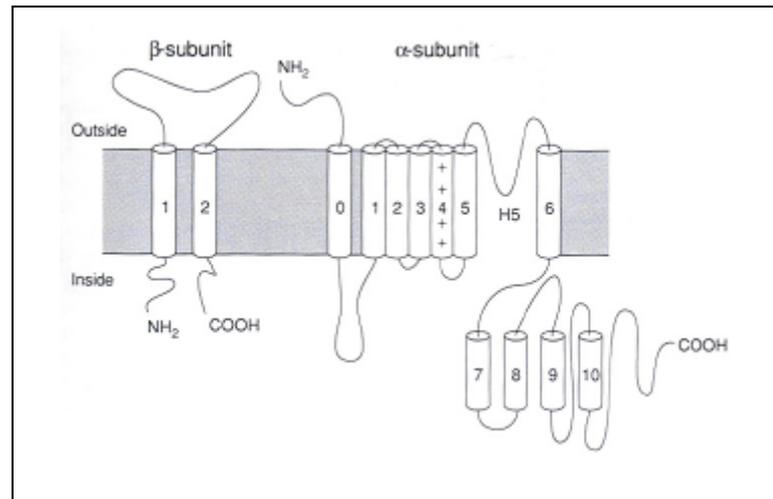
- (i) les maxi  $K_{Ca}$  (ou BK) ont une conductance unitaire de 100 à 250 pS dans des conditions symétriques de  $K^+$  (100 mM). Ils sont activés à la fois par dépolarisation et par des concentrations  $\mu M$  de calcium intracellulaire.
- (ii) Les canaux  $K_{Ca}$  de petite conductance (SK) ont des valeurs unitaires comprises entre 5 et 20 pS.
- (iii) Les canaux intermédiaires (IK) ont des conductances de l'ordre de 20 à 80 pS.

SK et IK ne sont pas sensibles aux changements de potentiel, mais sont activés par le calcium intracellulaire à des concentrations inférieures au mM.

Les canaux BK sont bloqués par le tétraéthylammonium ( $TEA^+$ ) et la charybdotoxine (CTX), mais sont insensibles à l'apamine, tandis que les canaux SK sont insensibles au  $TEA^+$ , mais sont majoritairement bloqués par l'apamine. La pharmacologie des canaux IK est plus proche de celle des canaux BK, car ils sont bloqués par la CTX et le clotrimazole, mais sont insensibles à l'apamine.

Dans le cas des canaux SK et IK, l'activation perdure tant que la concentration en calcium intracellulaire est suffisante.

La composition et la structure des canaux sont différentes suivant leur type (Figure 8). Ainsi les canaux BK sont composés de 2 sous-unités,  $\alpha$  et  $\beta$ . La sous-unité  $\alpha$  est constituée de 11 hélices  $\alpha$ , 7 transmembranaires (S0-S6) et 4 cytoplasmiques. La région S1-S6 ressemble beaucoup à la structure des canaux Kv avec l'hélice S4 richement dotée de résidus basiques comme voltage-sensor. Le filtre de sélectivité est également présent dans l'hélice H5, entre S5 et S6. La sous-unité  $\beta$  possède 2 hélices transmembranaires et augmente la sensibilité des canaux BK à la CTX.



**Figure 8** : Prédiction de structure des deux sous-unités des canaux BK (Ashcroft, 2000)

Les canaux SK et IK ont la même structure que les canaux Kv avec 6 hélices transmembranaires et le voltage-senseur en S4, les canaux IK étant juste un peu plus courts en Nter. Les canaux SK peuvent également être hétéromultimériques par le co-assemblage des sous-unités SK1 et SK2, créant ainsi des canaux SK avec de nouvelles propriétés (Ishii et al., 1997).

Jusqu'à aujourd'hui, aucune pathologie humaine n'a pu être associée de façon certaine aux canaux  $K_{Ca}$ . Cependant, les canaux SK3 seraient impliqués dans une des myopathies génétiques les plus répandues, la dystrophie musculaire myotonique.

#### 2.3.2.2. $K_{Na}$

Les canaux potassiques activés par  $Na^+$  sont présents dans les myocytes cardiaques et divers neurones de vertébrés et invertébrés. La concentration en ions sodiques agit en augmentant la probabilité d'ouverture des canaux  $K_{Na}$  ( $P_0$ ), avec un  $K_{1/2}$  compris entre 40 et 70 mM de  $Na^+$ .

Il sont inhibés par le 4-AP (4-amino pyridine) et sont insensibles au TEA (tétra-éthyl-ammonium). Leur ouverture contrebalance l'effet d'entrée du sodium, contribuant ainsi à la phase de repolarisation du potentiel d'action et au contrôle du potentiel de repos et de la durée des réponses aux neurotransmetteurs excitateurs.

L'activation de ces canaux reste une énigme sur un certain point, à savoir que le seuil d'activation minimal est de 10 mM en  $Na^+$ , ce qui est très élevé, surtout en comparaison de la très faible entrée en sodium (<0,2 nM) lors de l'ouverture des

canaux  $\text{Na}^+$ . Même une possible accumulation des ions  $\text{Na}^+$  dans l'espace périplasmique ne serait pas suffisante. Le mystère est toujours à élucider...

#### 2.3.2.3. $K_{\text{ATP}}$

Les canaux potassiques sensibles à l'ATP ( $K_{\text{ATP}}$ ) sont inhibés par des concentrations proches du micromolaire d'ATP<sup>4</sup>. Toutes leurs caractéristiques seront présentées dans la troisième et dernière partie de l'introduction.

### 2.3.3. Les canaux directement activés par des récepteurs

Ce chapitre regroupe les canaux liés aux récepteurs à l'acétylcholine de type muscarinique ou nicotinique, les canaux liés aux récepteurs au glutamate de type AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionate), kainate ou NMDA (N-méthyl-D-aspartate), les canaux liés aux récepteurs de la glycine et les canaux liés aux récepteurs GABA<sub>A</sub>.

Ces récepteurs sont principalement présents dans le système nerveux et le cerveau et notamment à proximité des liaisons synaptiques.

Il existe deux types de récepteurs. Les métabotropiques n'ont pas de fonction canal proprement dite, mais génèrent la production d'un messager secondaire activant certains canaux. Les autres types de récepteur qui nous intéressent davantage, sont les ionotropiques qui ont une fonction canal intrinsèque modulée par la fixation d'un ligand.

Dans le cas du récepteur de l'acétylcholine (AChR), les récepteurs muscariniques sont métabotropiques, tandis que les récepteurs nicotiniques forment, en leur sein, un pore perméable aux cations ( $\text{Na}^+$  principalement, mais également  $\text{Ca}^{2+}$ ). Les récepteurs au glutamate (GluR), qu'ils soient AMPA, kainate ou NMDA, sont tous les trois des canaux perméables aux cations ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$  pour les récepteurs NMDA). Les récepteurs de la glycine et GABA<sub>A</sub> sont quant à eux, des canaux perméables aux anions comme les ions  $\text{Cl}^-$ .

### 2.3.4. Les canaux modulés par les nucléotides cycliques

Les canaux modulés par les nucléotides cycliques ont été décrits dans de nombreux types cellulaires: dans les cellules photoréceptrices dans les neurones sensoriels olfactifs, et les neurones en général, dans les cellules cardiaques et dans le rein.

Leur régulation est faite par fixation directe des nucléotides cycliques sur le canal. Deux familles de canaux ont été observées : les canaux régulés par les nucléotides cycliques (CNG : cyclic nucleotide-gated channels) ; et les canaux régulés par les nucléotides cycliques et activés par hyperpolarisation (HCNG : hyperpolarization-activated cyclic nucleotides-gated channels).

La famille des CNG est composée de 6 membres : brCNGC $\alpha$  (br : bovine rod, ou bâtonnet rétinien de bovin), brCNG $\beta$ , bcCNGC $\alpha$  (bovine cone, ou cône rétinien de bovin), ro CNGC $\alpha_1$  (ro : rat olfactory, ou système olfactif du rat), roCNGC $\alpha_2$ , DmCNGC (Dm : *Drosophila* muscle, ou muscle de *Drosophila*).

La sous-unité  $\alpha$  ressemble beaucoup aux canaux Kv, mises à part l'absence de charge positive dans l'hélice S4 servant de voltage-sensor, et la présence du domaine de liaison de nucléotides cycliques en Cter et du domaine de fixation de la calmoduline en Nter.

La sous-unité  $\beta$  a la même structure que la sous-unité  $\alpha$  mais elle est beaucoup plus grande (240 kDa au lieu de 62 kDa pour la sous-unité  $\alpha$ ).

Même si les deux sous-unités sont capables de s'associer en homomultimères, la plupart des canaux CNG sont des hétéromultimères.

Ils sont perméables aux cations monovalents tels que Na<sup>+</sup> et K<sup>+</sup>. Pourtant les ions Ca<sup>2+</sup> sont également perméants tout en agissant comme des bloqueurs voltage-dépendants sur la perméabilité des cations monovalents.

Leur rôle physiologique est de transformer l'énergie lumineuse reçue par les bâtonnets rétiniens en signaux électriques *via* la cascade : Rhodopsine → Transducine → Phosphodiesterase → transformant GMPc en GMP. La baisse de la concentration en cGMP provoque la fermeture des canaux, source d'une hyperpolarisation membranaire qui est le début du signal électrique. Dans les cellules olfactives, l'activation du canal se fait par fixation des molécules odorantes sur leur récepteur, activant des protéines G dont la sous-unité  $\alpha$  est la partie activatrice de l'adénylate kinase qui transforme l'ATP en AMPc (activateur endogène des canaux CNG olfactifs).

Les mutations sont sources de maladies telles que la rétinite pigmentaire.

Les canaux HCNG sont également perméables aux cations Na<sup>+</sup> et K<sup>+</sup>, mais leur conductance est très faible et ils sont activés par une hyperpolarisation

membranaire. Trois membres sont actuellement connus : HAC1, HAC2, HAC3 qui ont ~60% d'identité de séquence entre eux, mais seulement 30% avec les canaux CNG. Ils sont présents dans différents types cellulaires et notamment dans les neurones, les myocytes cardiaques et les photorécepteurs.

### 2.3.5. Les canaux mécanosensibles

Ces canaux permettent de convertir la pression et l'étirement en signaux électriques dans les cellules des faisceaux musculaires, des corpuscules de Pacini et dans les cellules en brosse de l'oreille. On les retrouve également dans les cellules musculaires squelettiques, lisses et cardiaques, ainsi que dans les cellules épithéliales, hépatiques, végétales, dans les ovocytes de *Xénopes*, dans les bactéries et les levures.

Il en existe deux types, les canaux activés par la pression et l'étirement (SA : stretch-Activated) et les canaux inhibés par ces stimuli (SI : stretch-inactivated).

Les canaux SA ont quatre types de sélectivité ionique : (i) SA-non qui sont non sélectifs, (ii) SA-An perméables aux anions sans sélectivité, (iii) SA-Cat perméables aux cations mais sans sélectivité également, et (iv) SA-K sélectif pour le potassium.

Les canaux SI sont principalement des canaux potassiques.

Leur activation est due à l'augmentation de la probabilité d'ouverture de la porte en fonction de la pression. Cette pression serait transmise soit directement *via* les lipides membranaires (mécanisme intrinsèque), soit indirectement *via* des éléments du cytosquelette ou des éléments extracellulaires (mécanisme extrinsèque).

Certains sont même sensibles au potentiel.

Leur fonction première est la régulation du volume cellulaire et la mécanotransduction.

### 2.3.6. Les canaux induits par les cytolytines

Des toxines animales ou bactériennes sont capables de former des canaux (palytoxine,  $\alpha$ -latrotoxine...). Ce faisant, elles augmentent la perméabilité cationique membranaire et provoquent la lyse des érythrocytes. Leurs interactions se font soit avec des protéines, soit avec des phospholipides membranaires.

Leur conductance oscille entre ~10 et 100 pS, et contrairement à la plupart des autres canaux « endogènes » aux cellules hôtes, ces canaux n'ont pas de porte, mais sont activés-inactivés par agrégation-désagrégation.

### 2.3.7. Les canaux endocellulaires

Des canaux sélectifs pour les ions  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Cl}^-$  sont présents non seulement à la surface de la membrane plasmique, mais également dans les membranes des organelles intracellulaires tels que le réticulum sarco- et endoplasmique, les mitochondries et le noyau. Les mieux connus sont les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  du réticulum sarcoplasmique, à savoir le récepteur à la ryanodine et le récepteur de l'inositol 5'-triphosphate.

#### 2.3.7.1. Le récepteur à la ryanodine

La ryanodine est un alcaloïde neutre d'origine végétal. Son récepteur, RyR, est un homotétramère conséquent composé de sous-unités de 500 à 600 kDa. Son rôle est d'assurer la libération du calcium stocké dans le réticulum endo- et sarcoplasmique durant les phases d'activation cellulaire. En diffusant dans le cytoplasme, le calcium joue son rôle de second messager et déclenche la contraction dans les cellules musculaires en se fixant sur les protéines contractiles.

Trois isoformes de RyR sont connues à ce jour : RyR1 dans le muscle squelettique, RyR2 dans le myocarde et RyR3 dans le cerveau (Dubois, 1999).

Des protéines voisines interagissent avec RyR, telles que le récepteur des dihydropyridines *via* la sous-unité  $\alpha_1$  qui est aussi un canal calcique de type L. L'interaction est directe dans le muscle squelettique et indirecte dans le myocarde, *via* le calcium (calcium-induced calcium release).

Une autre protéine membranaire associée est la triadine qui relie RyR au canal calcique de type L. Un autre rôle serait de maintenir la calséquestrine à proximité comme le fait la junctine.

#### 2.3.7.2. Le récepteur de l'inositol 5'-triphosphate

Deux grandes voies de signalisation sont responsables de la production de InsP3. La plus connue fait intervenir des récepteurs liés à des protéines G. Ainsi la liaison de certaines hormones ou de certains neurotransmetteurs sur leurs récepteurs situés dans la membrane plasmique entraîne l'activation de phospholipases  $\text{C}\beta$  *via* des protéines G couplées à ces récepteurs. La fixation de InsP3 sur RinsP3 provoque la libération du calcium stocké dans le réticulum endo- et sarcoplasmique. La seconde voie de production de InsP3 fait intervenir des

récepteurs ayant une activité tyrosine kinase (Y) qui interagissent directement avec la phospholipase C $\gamma$  qui dégrade le PIP<sub>2</sub> en InsP3 et diacylglycérol.

RInsP3 est présent dans de nombreux tissus, mais est majoritaire au niveau des cellules de Purkinje du cervelet. C'est une protéine glycosylée tétramérique d'environ 1 MDa (220 à 260 kDa par monomère). A ce jour, 5 types de RInsP3 ont été clonés, mais les isoformes IV et V ressemblent beaucoup à l'isoforme II.

Sa sensibilité pour l'InsP3 est de 0,2  $\mu$ M (EC50). La régulation par le calcium est double : un effet activateur aux concentrations submicromolaires, et inhibiteur aux concentrations supérieures. L'ATP, PKA, mais également PKC et CaMKII sont des cofacteurs essentiels à la libération du calcium.

### **2.3.8. Les canaux potassiques rectifiants entrants**

Les canaux potassiques rectifiants entrants (Kir : K<sup>+</sup> inward rectifier) constituent une grande famille répartie en 7 groupes (Kir1.x-Kir7.1). Leurs fonctions, leurs régulations, leurs propriétés électrophysiologiques sont différentes, cependant ils conservent la même architecture moléculaire, présentent tous une rectification entrante faible ou forte et ont pour rôle physiologique majeur de stabiliser le potentiel de repos à une valeur proche du potentiel d'équilibre du potassium.

Les rectifiants forts sont impliqués dans la régulation de l'excitabilité des cellules. Ils sont localisés principalement dans les neurones, le muscle cardiaque, et les muscles squelettiques. Les rectifiants faibles comme Kir6.2, sont capables de laisser passer plus de courant sortant. Leur activation supprime également l'excitabilité de certaines cellules. Certains canaux Kir, comme les canaux régulés par les protéines G, transmettent l'effet d'hormones et de neurotransmetteurs dans les cellules excitables du cœur ou du cerveau en couplant la fixation du ligand à l'activité électrique de la cellule. Comme nous le verrons dans les chapitres suivants, les canaux K<sub>ATP</sub> sont eux régulés par les nucléotides cytosoliques.

La rectification est due, dans le cas des canaux Kir, au blocage du pore par des ions tels que Na<sup>+</sup> et Mg<sup>2+</sup> sur Kir1.1 et Kir6.2 par exemple, mais également des polyamines comme la spermine (4<sup>+</sup>), la spermidine (3<sup>+</sup>), la putresceine (2<sup>+</sup>).

### 2.3.8.1. Structure des canaux Kir

Les premiers canaux rectifiants entrants ont été clonés en 1993. Il s'agit de ROMK1, IRK1 et GIRK1 (Ho et al. 1993 ; Kubo et al. 1993a,b). Les nomenclatures ayant été harmonisées, ils se nomment maintenant respectivement Kir1.1a, Kir2.1 et Kir3.1. Depuis, sept sous-familles ont été décrites et classées selon leurs identités de séquence.

Ces canaux possèdent tous deux hélices  $\alpha$  transmembranaires (TM1, TM2), plus l'hélice H5 qui contient le filtre de sélectivité pour le potassium. Leur taille avoisine 390 à 500 résidus pour des masses moléculaires proches de 40 kDa. L'absence d'hélice ressemblant à S4 des canaux Kv explique la faible influence du voltage sur leur probabilité d'ouverture. A noter également que les parties Nter et Cter sont cytoplasmiques et peuvent interagir avec d'autres protéines telles que la protéine PSD-95 (postsynaptic density-95) avec la partie extrême du C<sub>ter</sub> des canaux Kir2.0 et Kir4.0, ou contenir des motifs de rétention dans le réticulum endoplasmique tels que RKR chez Kir6.2.

Les canaux Kir sont des tétramères, soit homomultimériques, soit hétéromultimériques comme c'est le cas avec les canaux couplés aux protéines G Kir3.1 et Kir3.2 dans le cerveau (Kofuji et al., 1995) et Kir3.1 et 3.4 dans le cœur (Krapivinsky et al., 1995). Ces différences de composition étendent la variété des propriétés électrophysiologiques de ces canaux. A cela s'ajoute la présence de sous-unités "régulatrices" au canal, telles que le récepteur des sulfonyles associé à Kir6.x, ou CFTR à Kir1.1 (McNicholas et al., 1996).

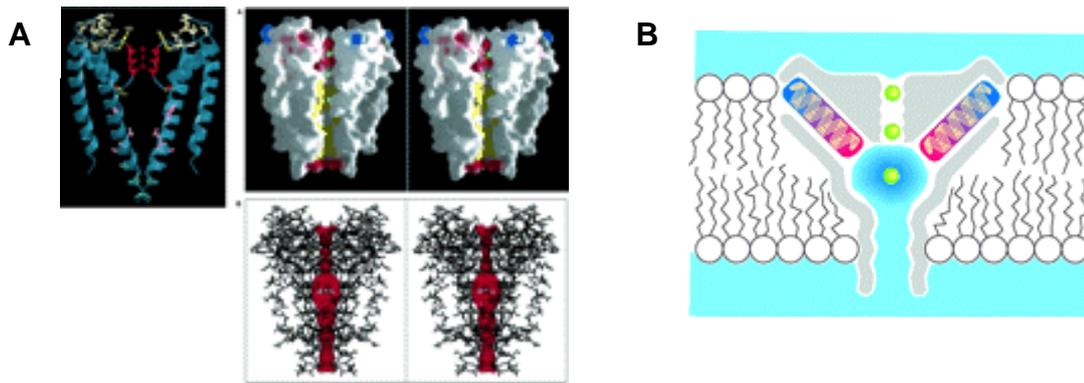
Les différents Kir sont exprimés par différents gènes localisés sur plusieurs chromosomes (Tableau 3).

Gène (humain)	Protéine	Localisation chromosomique (humain)	Localisation tissulaire majoritaire	Références
KCNJ1	Kir1.1 (ROMK)	11q24	Rein	Yano et al., 1994
KCNJ2	Kir2.1 (IRK)	17	Co�r	Raab-Graham et al., 1994
KCNJ3	Kir3.1 (GIRK1)	2q24.1	Coeur, cerveau	Stoffel et al., 1994
KCNJ6	Kir3.2 (GIRK2)	21q22.1-22.2	Cerveau	Sakura et al., 1995b
KCNJ9	Kir3.3 (GIRK3)	1q21-q23	Cerveau	Lesage et al., 1995
KCNJ5	Kir3.4 (GIRK4)	11q24	Coeur	Tucker et al., 1995
KCNJ8	Kir6.1	12p11.23	Ubiquitaire	Inagaki et al., 1995c
KCNJ11	Kir6.2 (K <sub>ATP</sub> )	11p15.1	Pancréas, coeur, cerveau, muscle squelettique	Inagaki et al., 1995b
KCNJ13	Kir7.1	2q37	cellules épithéliales, cerveau, poumons, rein	Doring et Karschin 2000

**Tableau 3** : G nes, protéines et localisation chromosomique et tissulaire de différents Kir (Ashcroft, 2000)

La structure du pore des canaux potassiques a été élucidée grâce à la cristallisation en 1998 d'un canal bactérien de *Streptomyces lividans*, le canal KcsA (Doyle et al., 1998) (Figure 9).

La structure du tétramère ressemble à un tipi inversé. L'hélice TM1 forme la partie externe du canal, tandis que l'hélice  $\alpha$  TM2 forme le pore proprement dit. La voie d'entrée extracellulaire des ions K<sup>+</sup>, en condition physiologique, est structur e en entonnoir grâce à l'hélice H5 qui conduit les ions K<sup>+</sup> vers le filtre de sélectivité GYG. Ce filtre est la zone la plus étroite du pore, ce qui permet une première sélection des ions perméants selon leur taille, mais également de créer des liaisons électrostatiques directes avec l'ion. Ces interactions nécessaires au passage de l'ion procurent le gain énergétique suffisant pour compenser le coût de la déshydratation des ions perméants (K<sup>+</sup>). Les interactions filtre-ions se produisent *via* les atomes d'oxygène des carbonyles de la chaîne **principale** des r sидus tyrosine et glycine. Le noyau aromatique de la chaîne latérale du r sидu Tyr sert à rigidifier l'ensemble du filtre, en s'ancrant dans un feuillet massif de r sидus aromatiques Trp, Phe dont l'hélice interne (TM2) est richement pourvue (12 dans le tétramère). Sans cela, le filtre ne serait pas aussi sélectif à cause de la trop grande mobilité des atomes qui empêcheraient les liaisons spécifiques aux distances strictes, et à la taille du pore qui fluctuerait en laissant passer des ions plus gros ou mal déshydratés.

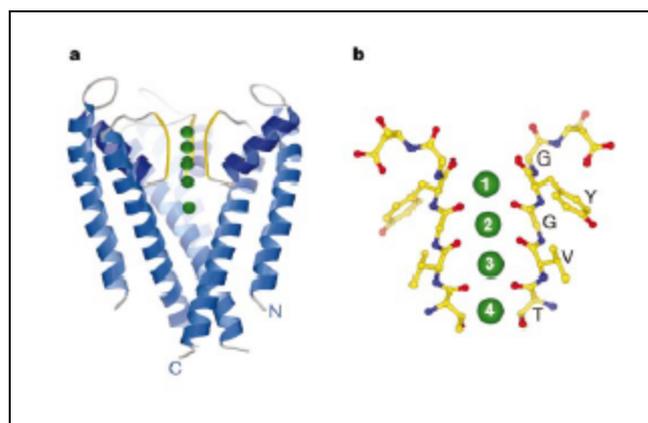


**Figure 9** : Structure du canal KcsA (Doyle et al., 1998)

**A)** Donnée cristallographique sous différentes formes. **B)** Schématisation du passage des ions potassiques (en vert) à travers le champ électrostatique créé par le macrodipôle des hélices H5.

Sous la partie cytoplasmique du filtre se trouve le vestibule, sorte de poche dans laquelle l'ion  $K^+$  peut se réhydrater et sortir du côté cytoplasmique à l'embouchure plus large que la voie d'entrée.

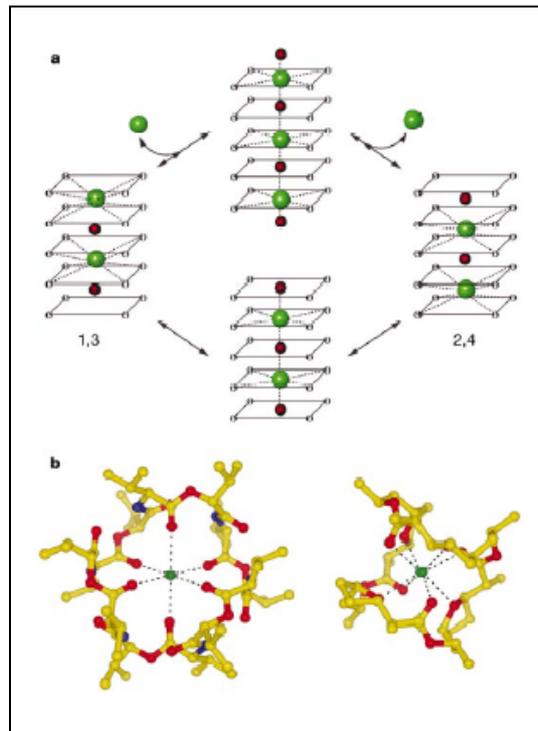
Le premier modèle de transition des ions potassiques à travers le filtre de sélectivité postulait pour le passage de 2 ions  $K^+$  dont l'entrée d'un dans le filtre provoquerait la répulsion électrostatique des autres et donc leur sortie. Depuis, le modèle s'est beaucoup étoffé, grâce aux travaux des membres du laboratoire de R. MacKinnon, qui tentent d'expliquer les mystères du passage des ions  $K^+$  à travers le pore en 10 nanosecondes. Morais-Cabral et al., 2001, démontrent qu'il existe 4 positions possibles pour les ions  $K^+$  dans le filtre de sélectivité étendu aux résidus TVGYG (Figure 10).



**Figure 10** : Site de fixation des ions  $K^+$  dans le canal KcsA (Morais-Cabral et al. 2001)

**a)** Représentation en ruban de la structure tridimensionnelle du canal, en vue latérale. **b)** Agrandissement du schéma sur la zone du filtre de sélectivité.

De la sorte, deux configurations sont possibles pour deux ions  $K^+$ , (i)  $K^+$ -eau- $K^+$ -eau (configuration 1,3) ; (ii) eau- $K^+$ -eau- $K^+$  (configuration 2,4). Les deux configurations ont une différence d'énergie nulle. A noter que le diamètre d'un atome de potassium est de  $2,7\text{\AA}$ . Dans la Figure 11, sont schématisés les différentes liaisons de coordination entre les atomes d'oxygène des chaînes principales et l'ion  $K^+$ , expliquant ainsi le passage d'une configuration à une autre.



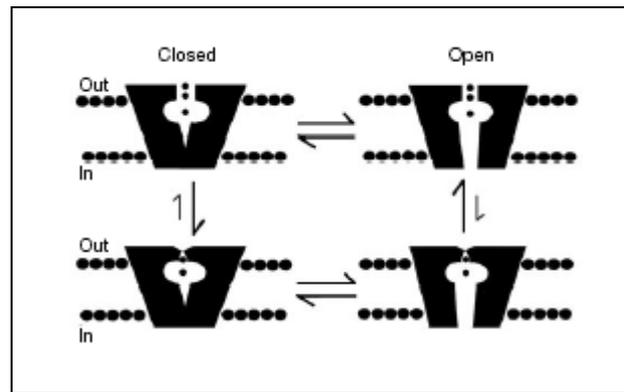
**Figure 11** : Cycle des liaisons électrostatiques pour la traversée des ions  $K^+$  (Morais-Cabral et al. 2001)

**a)** Description détaillée du cycle de liaisons des ions  $K^+$  (en vert) avec les atomes d'oxygène du filtre de sélectivité. Les molécules d'eau sont représentées en rouge. Dans les configurations les plus stables (1,3 et 2,4), un ion potassium est coordonné à 8 atomes d'oxygène. **b)** Structures atomiques des antibiotiques spécifiques de  $K^+$ , la nonactine à droite et la valinomycine à gauche qui ont respectivement 8 et 6 atomes d'oxygène coordonnés avec un ion potassique.

Les configurations d'énergies minimales (1,3 et 2,4) nécessitent la coordination de l'ion  $K^+$  avec 6 atomes d'oxygène, ce qui est physiquement possible dans le cristal (Figure 11b).

Zhou et al., 2001, ont démontré que (i) le transfert des ions  $K^+$  de la face intracellulaire vers la face extracellulaire se fait avec réarrangements spécifiques des atomes d'oxygène ; (ii) l'ion  $K^+$  présent dans le vestibule est hydraté par 8 molécules d'eau ; (iii) à faible concentration en potassium, le filtre perd un de ces ions déshydratés, induisant un réarrangement structural compensateur qui inhibe toute conductivité.

Le fonctionnement du canal s'effectuerait donc selon le schéma suivant (Figure 12) :



**Figure 12** : Modèle proposé de variations structurales du filtre de sélectivité en fonction de l'état de la porte et de la concentration en ions potassiques (Zhou et al. 2001)

En haut à gauche, la porte est fermée, deux chemins possibles, (i) soit la porte s'ouvre (schéma en haut à droite) et les ions  $K^+$  traversent le pore jusqu'à ce que la porte se referme ou que la quantité d'ion soit faible. Le filtre adopte la configuration "faible potassium" (en bas à droite), empêchant tout passage d'ions, (ii) soit elle reste fermée et le filtre adopte une configuration "faible potassium" (en bas à gauche) défavorable au passage des ions. La porte peut ensuite s'ouvrir (en bas à droite), mais le flux d'ions n'est toujours pas possible, expliquant les "longs" silences interbouffées (interburst).

### 2.3.8.2. Les différentes sous-familles de canaux Kir

Nichols et Lopatin, 1997, ont décrit les différentes sous-familles des canaux Kir, dont voici un résumé.

#### 2.3.8.2.1. ***Kir1.x***

Kir1.1 code pour un canal rectifiant entrant faible qui est principalement localisé dans le rein et de nombreux tissus du cerveau. Des épissages alternatifs du gène de l'extrémité 5' produisent de nombreux variants.

#### 2.3.8.2.2. ***Kir2.x***

Il existe 3 membres ayant chacun une conductance différente à 140 mM de potassium externe : Kir2.1 : ~20 pS, Kir2.2 : ~35 pS, Kir2.3 : ~10 pS. Ils sont sensibles à la phosphorylation et autres messagers. Leur localisation semble ubiquitaire dans le cœur et le système nerveux.

#### 2.3.8.2.3. ***Kir3.x***

Tous les membres de cette famille (Kir3.1 à Kir3.4) sont des canaux potassiques rectifiants forts et activés par les protéines G. Ils sont localisés dans le cœur, le cerveau et les cellules endocrines.

#### **2.3.8.2.4. Kir4.x et Kir5.x**

Ces deux familles n'ont qu'un membre chacune : Kir4.1 et Kir5.1. Ils sont localisés dans le cerveau et ont une rectification faible. Kir5.1 ne peut former de canaux homomultimériques et doit s'associer à Kir4.1 en proportion 2:2.

#### **2.3.8.2.5. Kir6.x**

Cette famille comprend deux membres actuellement connus, Kir6.1 et Kir6.2 qui composent en partie les canaux  $K_{ATP}$ . Ils semblent ne pouvoir s'exprimer seuls en condition physiologique et doivent être associés au récepteur des sulfonylurées pour s'exprimer dans la membrane. Toutes leurs caractéristiques seront présentées dans le chapitre  $K_{ATP}$  (page 70) qui leur est consacré.

#### **2.3.8.2.6. Kir7.1**

Cette famille ne possède qu'un unique représentant, cloné en 1998 à partir de cellules de l'intestin grêle (Krapivinsky et al, 1998 ; Partiseti et al., 1998). Il a également été localisé dans d'autres types cellulaires chez le rat, qui sont principalement des cellules épithéliales, telles que dans l'épithélium pigmenté de rétinal (Kusaka et al., 2001 ; Shimura et al., 2001) ou les tubules rénaux (Ookata et al., 2000) dans lesquels il participerait au recyclage des ions potassiques et serait couplé à la pompe  $Na^+/K^+$  (Nakamura et al., 1999).

Le gène de 1,45 kb (Doring et Karschin, 2000) comporte 5 à 6 exons selon les tissus (Nakamura et al., 2000), et code pour une protéine de 52 kDa, dans le rein (Ookata et al., 2000). Le canal a une architecture classique pour cette famille, avec deux hélices  $\alpha$  transmembranaires et le filtre de sélectivité GYG. Ayant une faible homologie avec les autres canaux Kir (<37%) (Doring et al., 1998), il fut classé dans cette nouvelle sous-famille de canaux potassiques rectifiants entrants, nommée Kir7.1.

Ses caractéristiques électrophysiologiques sont : une faible conductance potassique (30 pS) (Kim et al., 2000), une rectification moyenne, une faible

dépendance vis à vis de la concentration extracellulaire en potassium et une faible inhibition par les ions  $Ba^{2+}$  (Doring et al., 1998).

#### 2.3.8.3. Modulation

Beaucoup d'agents régulent l'activité des canaux Kir, comme les protons dans le cas des canaux Kir1.1 et  $K_{ATP}$  ; la phosphorylation dans le cas des canaux  $K_{ATP}$  du muscle lisse vasculaire activé par le peptide proche du gène de la calcitonine *via* la PKA (Quayle et al., 1994) ; le GTP sur le canal Kir3.0 ; l'ATP dans le cas des canaux  $K_{ATP}$ .

Beaucoup de maladies sont associées aux mutations des canaux Kir, dont les plus connues sont le syndrome de Bartter (Kir1.1), la maladie de la souris tricoteuse (weaver) (Kir3.2), l'absence de sécrétion d'insuline ou l'inverse, l'hyperinsulinémie hypoglycémique infantile persistante ( $K_{ATP}$ ).

### **2.4. Pharmacologie des canaux $K^+$**

Du fait de la grande diversité des canaux  $K^+$ , il faut être prudent sur la spécificité des agents pharmacologiques. Une action, qui semble spécifique d'un type de canal  $K^+$  donné dans une cellule, peut ne plus être spécifique dans un autre type cellulaire.

Beaucoup d'activateurs ou inhibiteurs sont connus, mais le bloqueur quasi universel est le césium ( $Cs^+$ ). Cependant son principal inconvénient en tant qu'outil pharmacologique est que son effet dépend du potentiel de membrane et du sens du passage des ions  $K^+$ . En effet, le  $Cs^+$  interagit avec un site localisé dans le pore, mais ne peut le traverser. De fait, le  $Cs^+$  bloque les courants sortants lorsqu'il est appliqué dans le cytoplasme et inversement, il bloque les courants entrants lorsqu'il est appliqué sur la face extracellulaire et que le courant  $K^+$  est également entrant. Car si on impose un potentiel qui inverse le sens du courant, les ions  $K^+$  délogeront les ions  $Cs^+$  de leur site.

Canaux / Courants	Activateurs	Bloqueurs
Retardés et transitoires sortants ( $K_V$ et $K_A$ )	Dépolarisation	$Cs^+$ , $Ba^{2+}$ , $Na^+_i$ , TEA, 4-AP, vérapamil, strychnine, quinine, capsaïcine, MCDP, DTX
Rectifiants entrants	Hyperpolarisation	$Mg^{2+}_i$ , $Na^+_i$ , $Cs^+$ , $Ba^{2+}$ , TEA
Activés par $Ca_i$ ( $K_{Ca}$ ) Grande conductance (BK) Conductance intermédiaire (IK) Petite conductance (SK)	$Ca^{2+}_i$ Dépolarisation	$Ba^{2+}$ , TEA, quinine, tubocurarine, CTX $Cs^+$ , $Ba^{2+}$ , quinine, tubocurarine, CTX Quinine, tubocurarine, strychnine, apamine
Couplés à des récepteurs par des protéines G	Neuromédiateurs Hormones	$Cs^+$ , $Ba^{2+}$ , 4-AP, quinine, muscarine, métacholine, bradykinine (IM) sérotonine (IS)
Sensibles à l'ATP ( $K_{ATP}$ )	Cromakalim, pinacidil, diazoxide	$ATP_i$ , TEA, 4-AP, quinine, tolbutamide, glibenclamide

**Tableau 4** : Principales substances interagissant avec les canaux  $K^+$  (Dubois, 1999).

TEA : TétrAethylAmmonium / 4-AP : 4-AminoPyridine / MCDP : peptide dégranulant les mastocytes / DTX : DenDroToxine / CTX : CharibdoToXine.

NB : le vérapamil, originellement supposé être un bloqueur spécifique des canaux  $Ca^{2+}$ , bloque également certains canaux  $K_V$ .

Le TEA bloque la plupart des canaux activés par dépolarisation avec une constante de dissociation apparente de 1 mM. Lorsque le TEA est appliqué sur la face externe de la membrane, le blocage est indépendant du potentiel de membrane et/ou de l'état (fermé, ouvert ou inactivé) des canaux. L'effet observé est une réduction de l'amplitude du courant. Par contre, lorsque le TEA est appliqué sur la face interne de la membrane, l'effet observé est une accélération apparente de l'inactivation du courant interprétée comme résultant du maintien des canaux dans l'état ouvert.

4-AP et les aminopyridines bloquent en général un certain nombre de canaux activés par dépolarisation avec un  $K_D$  de l'ordre de 0.1 mM.

A noter que le potentiel membranaire étant proche du potentiel d'équilibre du potassium, peu d'ions diffusent à travers la membrane, car le potentiel atteint rapidement celui de  $E_K$ . Le flux d'ions  $K^+$  est donc négligeable, et les équations faisant l'hypothèse d'une invariance des concentrations internes et externes sont presque vraies. Par contre si d'autres canaux maintiennent le potentiel à une valeur autre que  $E_K$ , les variations des différentes concentrations seront plus importantes.

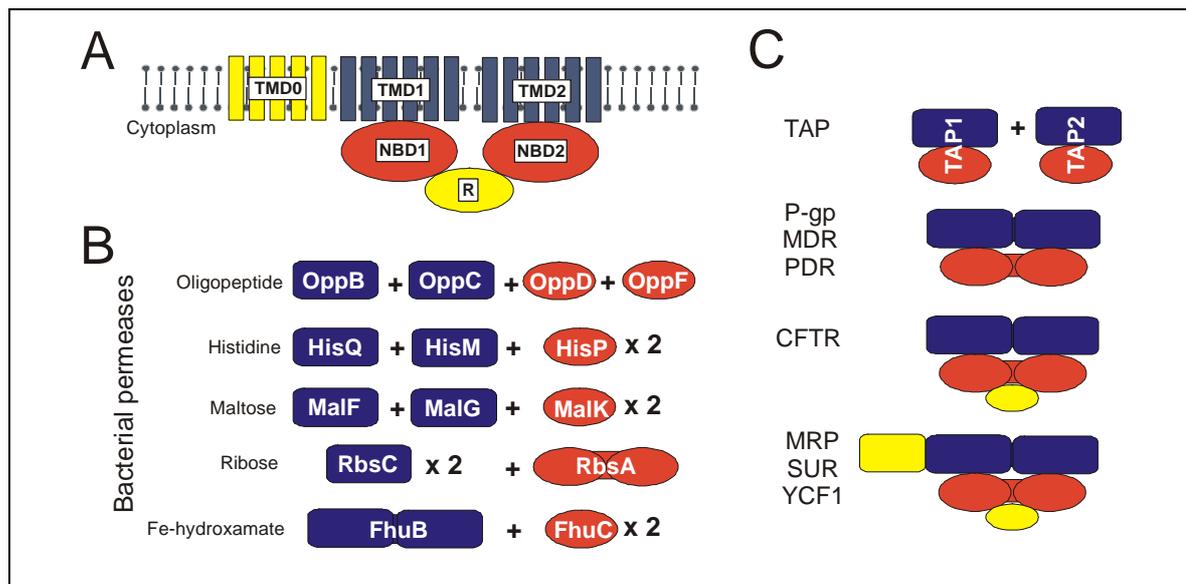
### 3. LES TRANSPORTEURS ABC

La famille des transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) est souvent citée comme une "super-famille" , car elle regroupe un grand nombre de protéines présentes de la bactérie à l'homme. Le programme HUGO de génotypage du génome humain, avait déjà recensé 30 transporteurs ABC humains en seulement deux ans de recherche (Klein, 1999). Nous en sommes aujourd'hui à 48 (<http://www.humanabc.org>) et au total, plus de 2000 protéines ABC ayant un domaine consensuel ATPase ont été découvertes en transcrivant différentes bases de données de nombreux génomes (<http://pasteur>). Cette richesse est si importante que la taille de toutes ces séquences réunies représente un génome bactérien complet.

Malgré les très nombreuses différences qui existent entre tous les membres de cette "super-famille", ceux-ci ont en commun plusieurs traits, principalement architecturaux (Figure 13). En effet, le premier critère qui permet de trouver un transporteur ABC dans une base de données protéique est la présence de la séquence signature LSGGQ. La deuxième caractéristique est la présence de domaines de liaison des nucléotides (NBD : Nucleotide Binding Domain) avec les séquences consensus de liaison des nucléotides Walker A et Walker B, plus la séquence linker ou motif C dans laquelle se trouve la séquence signature. La troisième caractéristique communes à tous les transporteurs ABC est l'architecture modulaire des structures secondaires. En effet, chaque transporteur ABC possède 4 domaines structuraux sous la forme de 2 domaines de liaison des nucléotides, et de 2 domaines transmembranaires composés de 6 hélices  $\alpha$ . Bien que ces structures super-secondaires soient prédites, elles furent de nombreuses fois validées par des expériences de cartographies avec insertion d'épitope, de cystéine (Cys-scanning), ou encore de site de glycosylation. Toutes les possibilités d'association de ces domaines sont possibles : NBD seul, NBD1-NBD2, TMD-NBD, NBD-TMD, TMD1-NBD1-TMD2-NBD2, TMD0-TMD1-NBD1-TMD2-NBD2. Des TMD seuls n'ont pas été mis en évidence, certainement en raison de l'absence de séquence signature dans ces régions.

Autour de ces caractères communs se greffent différentes variantes telles que des domaines structuraux supplémentaires, soit transmembranaires comme un domaine entier de 5 hélices  $\alpha$  par exemple, soit cytoplasmiques comme des sites

régulateurs ou de phosphorylation. La diversité peut prendre source également dans les partenaires des transporteurs ABC, qu'ils soient intracellulaires ou membranaires.



**Figure 13 :** Architecture modulaire des transporteurs ABC (M. Vivaudou)

**A)** L'architecture consensuelle des transporteurs ABC est composée de deux domaines transmembranaires de 6 hélices  $\alpha$  chacun (en bleu) et de deux domaines de liaison de nucléotides (en rouge). Des modules optionnels (en jaune) existent dans certains transporteurs ABC tels que des domaines régulateurs (R) ou un domaine transmembranaire supplémentaire de 5 hélices  $\alpha$  (TMD0). Ces domaines sont exprimés en sous-unités indépendantes comme cela est souvent le cas chez les procaryotes, ou en une seule chaîne polypeptidique plus fréquemment rencontrée chez les eucaryotes. **B)** Quelques transporteurs ABC bactériens. **C)** Quelques transporteurs eucaryotes. (M Vivaudou)

TMD : TransMembrane Domain / NBD : Nucleotide Binding Domain / R : domaine Régulateur / TAP : Transporter associated with Antigen Processing / P-gp : P-glycoprotein / MDR : MultiDrug Resistance protein / PDR : Pleiotropic Drug Resistance protein / CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator / MRP : Multidrug Resistance Protein / SUR : SulfonylUrea Receptor / YCF1 : Yeast Cadmium Factor.

Les transporteurs ABC ont été regroupés en 34 sous-familles sur la base de leur identité de séquence, confinant ainsi dans un même groupe des protéines ayant une architecture moléculaire, et souvent des fonctions, très proches.

Chez l'homme, 7 sous-familles ont été répertoriées : 1) MRP/CFTR, 2) MDR/TAP, 3) ALD, 4) ABC1, 5) White, 6) GCN20 et 7) OABP.

### 3.1. MRP/CFTR

La sous-famille MRP/CFTR (MRP : MultiDrug-resistance associated Protein, CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) à laquelle SUR (SulfonylUrea Receptor) appartient, est la plus importante chez l'être humain avec 11 membres : ABCC1-ABCC11. Les protéines ABCC1-ABCC5 correspondent respectivement, aux protéines MRP1-MRP5 ; ABCC6 à la protéine ARA

(anthracycline resistance associated protein) ; ABCC7 à CFTR ; ABCC8-ABCC9 au protéines SUR1 et SUR2 (SulfonylUrea Receptor) ; ABCC10 et ABCC11 n'ont pas de nom usuel et sont peu connues.

### **3.1.1. MRP1**

MRP1 (Multidrug Resistance-associated Protein) confère la résistance aux anticancéreux aux cellules qui la surexpriment. Elle expulse hors de la cellule les anticancéreux généralement hydrophobes, soit conjugués au glutathion, au glucuronide ou au sulfate, soit seulement en présence de ces co-transporteurs. Elle intervient dans la réponse inflammatoire en exportant un des médiateurs, le Leukotriène cystéinyl (LTC). Sa séquence est plus proche de CFTR que de P-gp qui a pourtant la même fonction (transport de xénobiotiques, mais non conjugués).

Structurellement, la protéine est composée d'une chaîne polypeptidique avec trois TMD et deux NBD arrangés de la façon suivante : TMD0-TMD1-NBD1-TMD2-NBD2.

### **3.1.2. MRP2**

Son autre nom est cMOAT pour canalicular Multispecific Organic Anion Transporter. Son dysfonctionnement est responsable du syndrome de Dubin-Johnson caractérisé par une hyperbilirubinémie.

La protéine MRP2 est localisée exclusivement dans la membrane canaliculaire des hépatocytes dans laquelle elle assure le transport de différents composés hydrophobes endogènes ou xénobiotiques conjugués avec un groupement glutathion, glucuronide ou sulfate. Les molécules conjuguées sont ainsi amphiphiles avec une partie hydrophobe et une partie chargée négativement, et sont expulsées dans la bile ou l'urine.

Son architecture moléculaire est identique à celle de MRP1

### **3.1.3. MRP3, MRP4, MRP5 et MRP6**

Leurs fonctions ne sont pas connues. Cependant nous savons que MRP3 est exprimé dans le foie, le colon et le rein (Belinsky et al., 1998) et qu'il transporte des conjugués anioniques et des sels biliaires (Hirohashi et al., 1999,2000).

MRP4 (MOAT-B) est grandement exprimé dans la prostate (Lee et al., 1998). Il transporte des composés antiviraux basés sur les nucléosides, ainsi que les mêmes substrats transportés par MRP5.

Cet dernier, MRP5 ou MOAT-C, est exprimé de façon importante dans le muscle squelettique, dans une moindre mesure dans le rein, les testicules, le cœur et le cerveau, et faiblement dans le foie (Belinsky et al., 1998). Ses substrats sont principalement des anions organiques, des analogues de nucléotides et des nucléotides cycliques (McAleer et al., 1999, Wijnholds et al., 2000, Jedlitschky et al., 2000).

MRP6 est essentiellement localisé dans le foie et le rein et ne serait pas impliqué dans la résistance aux anticancéreux des cellules tumorales, mais pourrait transporter des peptides.

MRP3 et MRP6 ont la même structure que MRP1 : TMD0-TMD1-NBD1-TMD2-NBD2, tandis que MRP3 et MRP4 sont dépourvus du TMD0 comme CFTR.

#### **3.1.4. CFTR**

CFTR est le transporteur ABC impliqué dans la maladie génétique létale la plus fréquente de la population caucasienne avec 1 enfant atteint sur 2500 : la mucoviscidose. La mutation la plus couramment rencontrée. Parmi les 800 mutations identifiées dans cette maladie, la délétion de la phénylalanine 508 ( $\Delta F508$ ) est responsable dans 70% des cas. Cette délétion entraîne un défaut d'adressage de CFTR qui ne s'exprime plus correctement vers la membrane plasmique. Les symptômes sont alors sévères, perte de la fonction exocrine du pancréas, mais également des glandes intestinales, de l'arbre biliaire, des glandes bronchiques et des glandes sudoripares.

Bien que très homologue à MRP1 et SUR, CFTR ne possède pas de domaine transmembranaire TMD0. Contrairement à ces mêmes transporteurs ABC, CFTR ne transporte pas de substrats, mais plutôt des ions chlorure. Ce canal est activé par l'AMPc et par phosphorylation des sites spécifiques de la protéine kinase A dans le domaine R situé entre le NBD1 et le TMD2. L'hydrolyse de l'ATP intervient également en influençant l'ouverture et la fermeture de la porte.

#### **3.1.5. SUR**

Les caractéristiques du récepteur des sulfonylurées SUR seront détaillées dans le chapitre des canaux  $K_{ATP}$ .

### **3.2. MDR/TAP**

Cette sous-famille comprend également 11 membres (ABCB1-ABCB2) dont les plus connus sont la glycoprotéine P (P-gp : ABCB1), MDR2/3 (Multidrug Resistance Protein), les protéines TAP1 et TAP2 (Transporter associated with Antigen Processing), l'ABC7 et BSEP (Bile Salt Export Pump).

#### **3.2.1. P-gp**

P-gp ou MDR1 est le premier transporteur ABC humain cloné. Il est présent dans la membrane plasmique sous forme d'une seule chaîne polypeptidique en conformation TMD1-NBD1-TMD2-NBD2. Sa surexpression dans les cellules cancéreuses induit une résistance aux agents anticancéreux hydrophobes.

#### **3.2.2. MDR3 et BSEP**

MDR3 et BSEP sont impliqués dans différents types de choléstase intrahépatique progressive et familiale. Ils ont respectivement 75 et 50% d'identité de séquence avec MDR1. BSEP est exprimé exclusivement dans le foie et transporte les sels biliaires vers le milieu extracellulaire. MDR3 permet la translocation des phospholipides, principalement dans les cellules hépatiques canaliculaires dans lesquelles il est fortement exprimé. La structure de ces deux protéines est identique à celle de P-gp.

#### **3.2.3. TAP1 et TAP2**

TAP1 et TAP2 sont quant à eux des demi-transporteurs (TMD-NBD), présents dans la membrane du réticulum endoplasmique. L'hétérodimère formé de ces deux protéines transporte du cytosol vers le lumen du réticulum endoplasmique, des peptides dégradés par le protéasome. Le peptide est ensuite pris en charge par le complexe CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de classe I qui présentera l'antigène au système immunitaire et notamment aux cellules T cytotoxiques qui détruisent ainsi les cellules infectées.

#### **3.2.4. ABC7**

ABC7 est localisé dans la membrane des mitochondries et son architecture moléculaire ressemble à celle des protéines TAP (TMD-NBD). Sa fonction n'est pas bien connue, cependant il s'agirait d'une protéine orthologue de ATM1 qui transporte

des éléments importants pour l'homéostasie du fer dans les mitochondries des levures.

### **3.3. ALD**

ALD signifie AdrénoLeukoDystrophie qui est une maladie neurodégénérative sévère liée au chromosome X, dont un homme sur 20.000 est atteint. La caractéristique de cette maladie est l'accumulation d'acides gras saturés à longues chaînes (24-30 carbones), et particulièrement l'hexacosanoate (C26), dans la matière blanche du cerveau, le cortex adrénal.

Cette sous-famille comporte 4 membres ayant tous une architecture de demi-transporteurs ABC (TMD-NBD). Ils sont référencés sous le nom de ABCD1 (ALD ou ALDP), ABCD2 (ALDL1 ou ALDRP), ABCD3 (PXMP1 ou PMP70) et ABCD4 (PXMP1 ou PMP69).

#### **3.3.1. ALD**

La protéine ALD est une protéine peroxysomale orientée vers le cytosol. Elle jouerait un rôle majeur dans l'import ou l'ancrage de l'enzyme peroxysomale VLCFA-CoA synthase (Very Long Chain Fatty Acid).

#### **3.3.2. PMP70**

PMP70 est également une protéine peroxysomale dont les mutations provoquent une perte de l'assemblage de peroxysomes fonctionnels durant le développement fœtal (syndrome cérébro-hépato-rénal de Zellweger).

#### **3.3.3. PMP69**

PMP69 et ALDRP forment des homo- et hétérodimères soit entre eux, soit avec des protéines partenaires très proches de ALD. Ces deux protéines auraient également un rôle dans la biogenèse du peroxysome.

### **3.4. ABC1**

Cette sous-famille comprend entre 11 et 13 membres (ABCA1-ABCA11-13) selon les bases de données. Cependant beaucoup sont peu connus, les plus célèbres étant ABC1 (ABCA1), ABC2 (ABCA2), ABC3 (ABCA3) et ABCR (ABCA4). Ces protéines sont parmi les plus grandes de toute la famille des transporteurs ABC humains (~2200 résidus).

### **3.4.1. ABC1**

ABC1 contient un grand domaine cytoplasmique d'origine et de fonction inconnues, dans lequel un petit segment hydrophobe, trop court pour faire un aller-retour dans la membrane, pourrait s'ancrer en partie dans la bicouche lipidique. A noter qu'aucune protéine très homologue à ABC1 n'est présente dans la levure.

Sa fonction, trouvée chez la souris, serait impliquée dans la destruction des cellules apoptotiques par les macrophages (Luciani et Chimini, 1996). De plus, ABC1 provoquerait un flux électroneutre d'anions dans la membrane des ovocytes de Xénope, et jouerait un rôle crucial dans la sécrétion de l'Interleukine-1 $\beta$ . Il transporterait des lipides et/ou du cholestérol. Il est également une cible pharmacologique pour lutter contre l'athérosclérose et est impliqué dans la maladie de Tangier.

ABC1 est présent dans différents tissus tels que le placenta, le foie, les poumons et différents tissus du fœtus. Sa structure correspond à un transporteur ABC en une seule chaîne polypeptidique (TMD1-NBD1-TMD2-NBD2).

### **3.4.2. ABC2**

ABC2 est le plus grand transporteur ABC humain avec 2436 résidus. Pourtant son architecture moléculaire prédite est identique à celle d'un transporteur ABC classique tel que ABC1. Cette protéine transporterait l'estramustine, un anticancéreux cytotoxique qui dépolymérise la tubuline, (Laing et al., 1998). ABC2 est principalement localisé dans le cerveau, les reins, les poumons et le cœur.

### **3.4.3. ABC3**

ABC3 a été classé dans cette sous-famille par homologie de séquence avec ABC1. Sa fonction est également proche, puisque ce transporteur est impliqué dans la destruction des cellules mortes ou apoptotiques. De plus il est largement exprimé durant l'embryogenèse. Sa structure est identique à celle de ABC1.

### **3.4.4. ABCR**

ABCR est un transporteur ABC de la rétine dont la mutation provoque la dystrophie maculaire de Stargardt récessive. L'extrémité Nter contiendrait des éléments importants pour la régulation en Cis, et notamment deux séquences proches de Ret-4 connues pour conférer une expression du gène spécifique des

photo-récepteurs. Sa localisation précise est la périphérie des bâtonnets rétiens sur la partie externe des disques. Le gène de ABCR a été le plus étudié dans la lutte contre les maladies génétiques oculaires.

Le substrat physiologique n'est pas connu, mais la phosphatidyl-éthanolamine est un bon candidat, tout comme le 11-cys-rétinal et le 13-cys-rétinal. La séquence peptidique d'ABCR a 50% d'homologie avec ABC1 et présente la même architecture moléculaire.

### **3.5. White**

La sous-famille White comprend 2 membres bien connus, ABCG1 (White ou ABC8) et ABCG2 (MXR1, BCRP ou ABCP). Le nom de cette sous-famille provient du gène White trouvé chez *Drosophila melanogaster* et qui est impliqué dans le transport des précurseurs des pigments de l'œil. De plus, il a une valeur historique puisqu'il fut le tout premier gène cartographié (Morgan, 1910).

ABCG1 et ABCG2 sont deux transporteurs ABC (TMD-NBD) qui s'homo- ou s'hétérodimérisent pour être fonctionnels.

#### **3.5.1. ABCG1 (White/ABC8)**

La protéine humaine a 33% d'identité de séquence avec la protéine de la drosophile.

Le rôle physiologique chez l'Homme n'est pas connu, cependant il pourrait intervenir dans le transport du tryptophane et de la guanine comme chez la drosophile, ainsi que dans les voies métaboliques des neurotransmetteurs.

#### **3.5.2. ABCG2 (MXR1/BCRP/ABCP)**

ABCG2 a été découvert dans des lignées cellulaires résistantes aux anticancéreux, d'où le nom de BCRP (Breast Cancer Resistance Protein) qui confère notamment à ces cellules la résistance à l'anthracycline en absence de P-gp et de MRP1. De même, cette protéine a également été mise en évidence dans des lignées cellulaires humaines de carcinome du colon qui résistaient à la mitoxantrone (MXR1 : Mitoxantrone Resistance associated protein 1), et ABCP a été ainsi nommé car cette même protéine fut également découverte dans le placenta (ABCP : Placenta-specific ABC gene).

Cette protéine n'a que 30% d'identité avec ABCG1 sur les 655 résidus qui la composent.

Plusieurs expériences de transfection de BCRP dans des lignées cellulaires humaines sensibles aux anticancéreux (MCF-7) ont montré que les cellules transfectées devenaient résistantes à la mitoxantrone, à la daunorubicine et à la doxorubicine. Ceci démontre l'implication de cette protéine dans l'expulsion des anticancéreux. Mais nous ne savons toujours pas, à l'heure actuelle, si cette protéine est un homodimère ou un hétérodimère.

### **3.6. GCN20**

Cette sous-famille est composée de trois membres : ABCF1 (ABC50), ABCF2 et ABCF3. Le plus connu est ABC50. Son gène est modulé par le facteur de nécrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Ce transporteur ABC est particulier car les 807 résidus qui le composent forment une protéine sous forme de dimère covalent de deux NBD (NBD1-NBD2) sans domaines transmembranaires, ce qui la rend très hydrosoluble (36% de résidus chargés contre 18 à 27% dans les autres transporteurs ABC). Il ne s'agit donc pas d'un transporteur à proprement parler, et jusqu'à présent les hypothèses s'orientent vers une localisation nucléaire car 3 signaux caractéristiques ont été trouvés dans la séquence : KKKR, RRKK et KRPK.

### **3.7. OABP**

Cette sous-famille ne contient actuellement, qu'un seul membre : ABCE1 (inhibiteur de la RNase L)

Le système 2-5A induit par interférons, implique trois enzymes : la 2-5A synthétase, la 2-5A phosphodiesterase et la RNase L.

Les 2-5A sont des oligomères de l'ATP formés par ces enzymes. Ces oligomères activent la ribonucléase L dépendante des 2-5A (la RNase L) qui est une enzyme effectrice de ce système. Cette activation conduit au clivage des ARNm et donc à l'inhibition de la synthèse des protéines. L'inhibiteur de la RNase régule l'activité de la RNase L en empêchant la fixation de 2-5A.

Ce transporteur ABC a la même particularité que la protéine ABC50, à savoir,, que sa structure ne se résume qu'à deux NBDs liés (NBD1-NBD2) sans domaine transmembranaire pour une taille également proche de 599 résidus.

### **3.8. Les transporteurs ABC d'autres organismes**

L'être humain n'est pas le seul à exprimer des transporteurs ABC dans ses membranes cellulaires. La mouche en possède 56 différents (à l'heure actuelle), le ver 31 et la levure 31 aussi. Cette dernière est très souvent utilisée comme système d'étude eucaryote pour comprendre la fonction d'un transporteur ABC, l'expérience la plus fréquente étant le test de complémentation de levure de transporteurs ABC délétés dans le génome levurien. Le transporteur ABC le plus homologue au récepteur des sulfonylurées est **YCF1** (Yeast Cadmium Factor 1). Il appartient à la sous-famille MRP/CFTR, avec une architecture moléculaire ressemblant à MRP1 et SUR (TMD0-TMD1-NBD1-TMD2-NBD2). YCF1 est localisé dans la membrane vacuolaire et permet à la levure de détoxifier son milieu intracellulaire en cadmium en accumulant ce métal lourd dans la vacuole. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, YCF1 est une pompe GS-X, c'est à dire qu'elle co-transporte le substrat lié au glutathion, comme le fait MRP1 (Li et al., 1996). En plus de ressembler à MRP1, YCF1 a également beaucoup de similitudes avec CFTR. En effet, la mutation de F713 de YCF1 est équivalente à la délétion de F508 dans CFTR, et abolit la détoxification du cadmium par YCF1. De même, la substitution d'une sérine en alanine dans la région centrale, un site potentiel de phosphorylation par PKA, induit des résultats similaires aux expériences faites dans le domaine régulateur de CFTR (Szczycka et al., 1994).

Dans le même ordre de comparaison, LmrA, *Lactococcus lactis* multidrug resistance protein, est l'orthologue bactérien de la protéine P-gp humaine.

Les transporteurs ABC eucaryotes sont majoritairement des "exporteurs" et des flippases (composés d'une à deux chaînes polypeptidiques), tandis que chez les procaryotes, ces protéines sont soit des "exporteurs", soit des "importeurs" qui permettent aux bactéries de pomper les substrats essentiels à leur survie dans des milieux pauvres. Leurs structures sont également très diverses, avec toutes les configurations possibles entre les NBD et les TMD (mis à part la présence de TMD seul). Grâce à cette séparation des domaines structuraux, il a été relativement aisé de purifier et cristalliser les NBD seuls [HisP (Hung et al., 1998), Rad50 (Hopfner et al., 2000), MalK\_TI (Bohm et al., 2002), TAP1 (Gaudet et Wiley, 2001)].

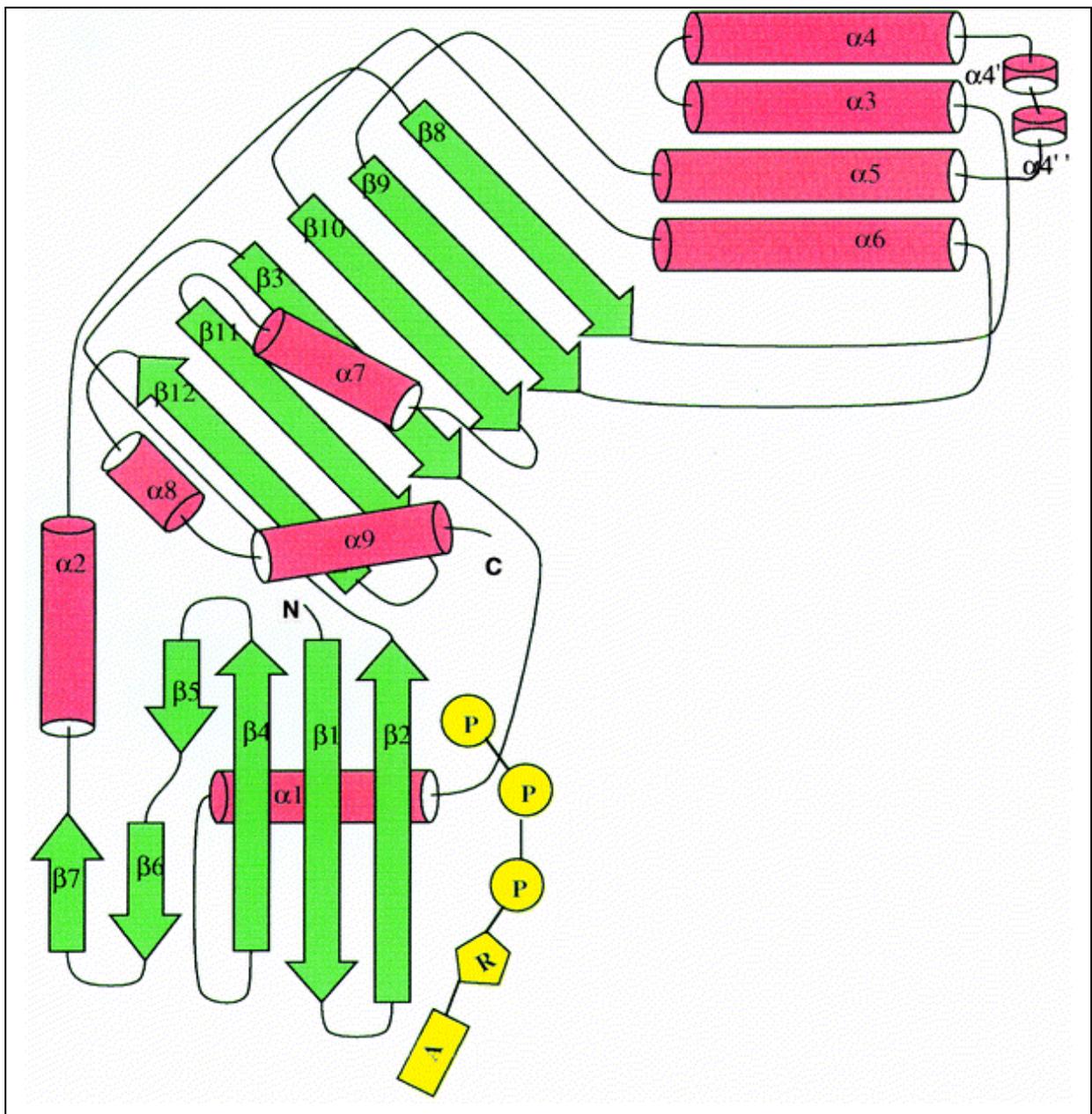
### **3.9. Structure des transporteurs ABC**

Tous ces transporteurs ABC ont, selon leur profil d'hydrophobicité, une architecture de structures secondaires semblables avec deux domaines

cytoplasmiques de liaison des nucléotides (NBD) et deux domaines transmembranaires de 6 hélices  $\alpha$  chacun. De nombreuses structures cristallines de NBD ont été publiées depuis quelques années, et nous disposons depuis peu, de celle d'un transporteur ABC complet, engendrant la proposition de différents modèles de mécanisme de transport. Ces découvertes sont décrites ci-dessous.

### **3.9.1. Structure des NBD**

Le premier NBD cristallisé fut celui du transporteur ABC HisP de *Salmonella typhimurium*. Cette Histidine perméase est un transporteur ABC périplasmique composé de HisM, HisQ et de deux HisP qui s'homodimérisent pour former les deux NBD, d'où la nomenclature HisQMP<sub>2</sub>. Chaque monomère est composé de 12 brins  $\beta$  formant deux feuillets  $\beta$  du bras 1 et de 9 hélices  $\alpha$ , dont 5 sont regroupés dans le bras 2 (Figure 14). Les "bras" sont des régions distinctes visibles sur la Figure 15 et forment un L inversé.



**Figure 14** : Structures super-secondaires de HisP (Hung et al., 1998)

En vert les brins  $\beta$ , en rouge les hélices  $\alpha$  et en jaune la molécule d'ATP.

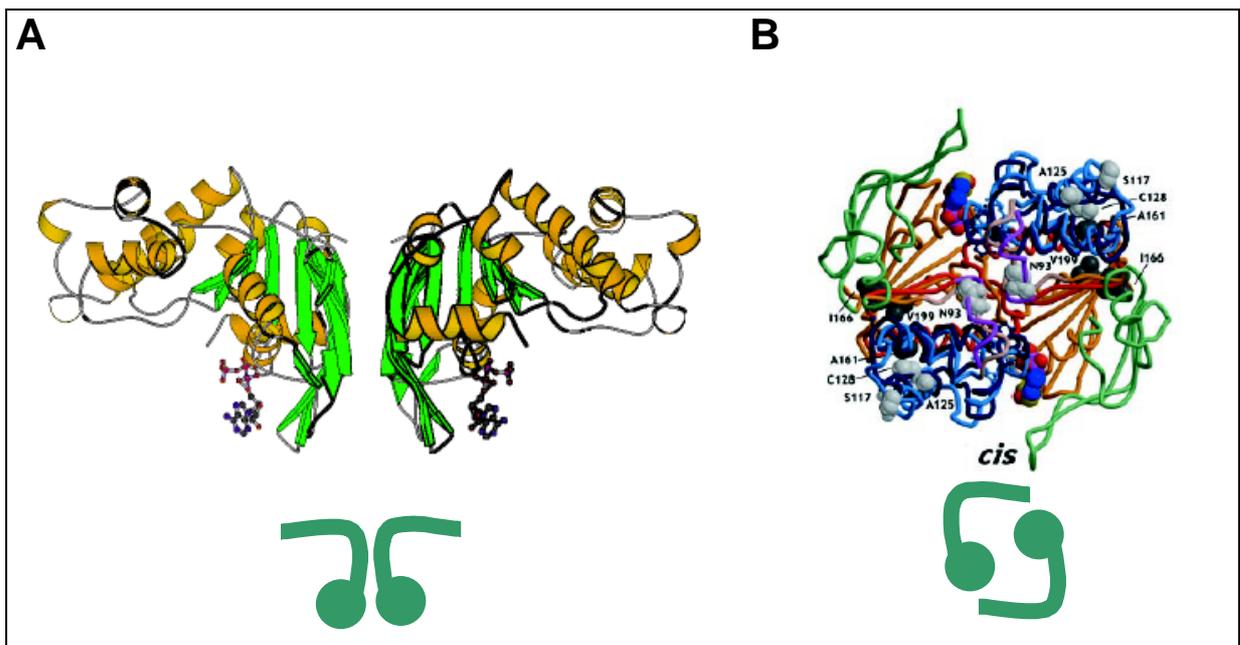
La séquence signature est située partiellement dans la partie Nter de l'hélice  $\alpha 5$ , tandis que la séquence walker A est située dans une boucle du bras 1 entre le brin  $\beta 4$  et l'hélice  $\alpha 1$ . Cette localisation dans une boucle laisse suffisamment de liberté à la chaîne latérale de la lysine45 pour se lier au phosphate  $\beta$ . La séquence walker B est quant à elle entièrement insérée dans le brin  $\beta 9$  dont l'aspartate ultra-conservée fixe le magnésium lié à l'ATP ou l'ADP.

Ces séquences ont un pourcentage d'homologie très élevé entre les différents transporteurs ABC, et parmi toutes les structures des NBD actuellement connues, on

constate que toutes les séquences consensus, walker A, walker B et motif C sont situées dans les mêmes structures secondaires et dans la même disposition spatiale au niveau de la structure tertiaire. Ainsi la seule différence significative entre MalK et HisP par exemple est la présence d'un motif hélice-brin supplémentaire dans HisP après le brin  $\beta 7$  (Diederichs et al., 2000).

Pour présenter sommairement les autres NBD cristallisés, Mal K correspond au domaine NBD du transporteur de maltose bactérien MalEFGK<sub>2</sub>. La structure publiée de MalK\_Tl provient de la souche *Thermococcus litoralis*. Rad50 est une protéine ubiquitaire impliquée dans la réparation double-brin de l'ADN. Rad50cd est un hétérodimère qui se dimérise avec un autre hétérodimère de Rad50cd pour générer une activité ATPase. MJ0796 et MJ1267 sont les domaines de liaison des nucléotides de transporteurs ABC exprimés par *Methanococcus jannaschii*.

La principale divergence entre ces structures est la forme dimérique des NBDs. En effet deux modèles s'opposent actuellement.



**Figure 15 :** Les deux modèles de dimérisation des NBD

**A)** modèle dos à dos de HisP (Hung et al. (1998)). **B)** modèle tête-pied ou 69 de MJ0796 (Yuan et al., 2001).

1) Le premier chronologiquement parlant, correspond au modèle  $\left[ \begin{array}{c} \text{L} \\ \text{L} \end{array} \right]$  dans lequel les deux monomères en forme de L sont dos à dos (HisP). Dans ce cas les deux poches de fixation sont éloignées et sans aucune interaction directe, les résidus de chaque monomère formant un site complet de fixation de MgATP ou MgADP. Malgré cet éloignement des sites d'hydrolyse de l'ATP, les deux NBD de HisP ne sont pas

équivalents comme le démontre la différence d'accessibilité des cystéines entre les deux protomères d'HisP (Kreimer et al., 2000).

2) Le deuxième modèle admis par les auteurs des structures de Rad50cd, MalK\_TI et MJ0796, correspond au modèle tête-pied [ ] dans lequel les deux NBD sont inversés l'un par rapport à l'autre. Ainsi, chaque poche de fixation des nucléotides est composée des résidus des deux NBD. Il a été montré que la séquence signature LSGGQ d'un protomère interagit avec le ribose et le groupement triphosphate fixés sur l'autre protomère (Hopfner et al., 2000), ce qui expliquerait le manque d'interactions électrostatiques et de liaisons hydrogène du premier modèle. De plus des mutations dans cette séquence inhibent l'activité ATPase (Schmees et al., 1999), renforçant l'hypothèse de son implication dans la liaison directe des nucléotides.

L'interface entre les dimères est composée majoritairement de résidus polaires et de quelques résidus apolaires avec principalement des chaînes latérales aromatiques. Aucune liaison hydrogène intermoléculaire ne maintient la structure quaternaire et l'énergie d'interaction n'est pas majoritairement hydrophobique mais plutôt électrostatique.

La comparaison des structures entre HisP fixant MgATP et MJ0796 fixant MgADP a permis de constater (i) une rotation vers l'extérieur du sous-domaine des hélices  $\alpha$  (bras 2) et que (ii) Gln 90 de MJ0796 forme des liaisons hydrogène avec le phosphate  $\gamma$  *via* une molécule d'eau, et tirerait légèrement tout un domaine d'hélice  $\alpha$  vers le site d'hydrolyse de l'ATP (Yuan et al., 2001). Sans être la force motrice du transport, ce changement conformationnel interviendrait dans l'échange des nucléotides di et triphosphorylés au niveau du site de fixation.

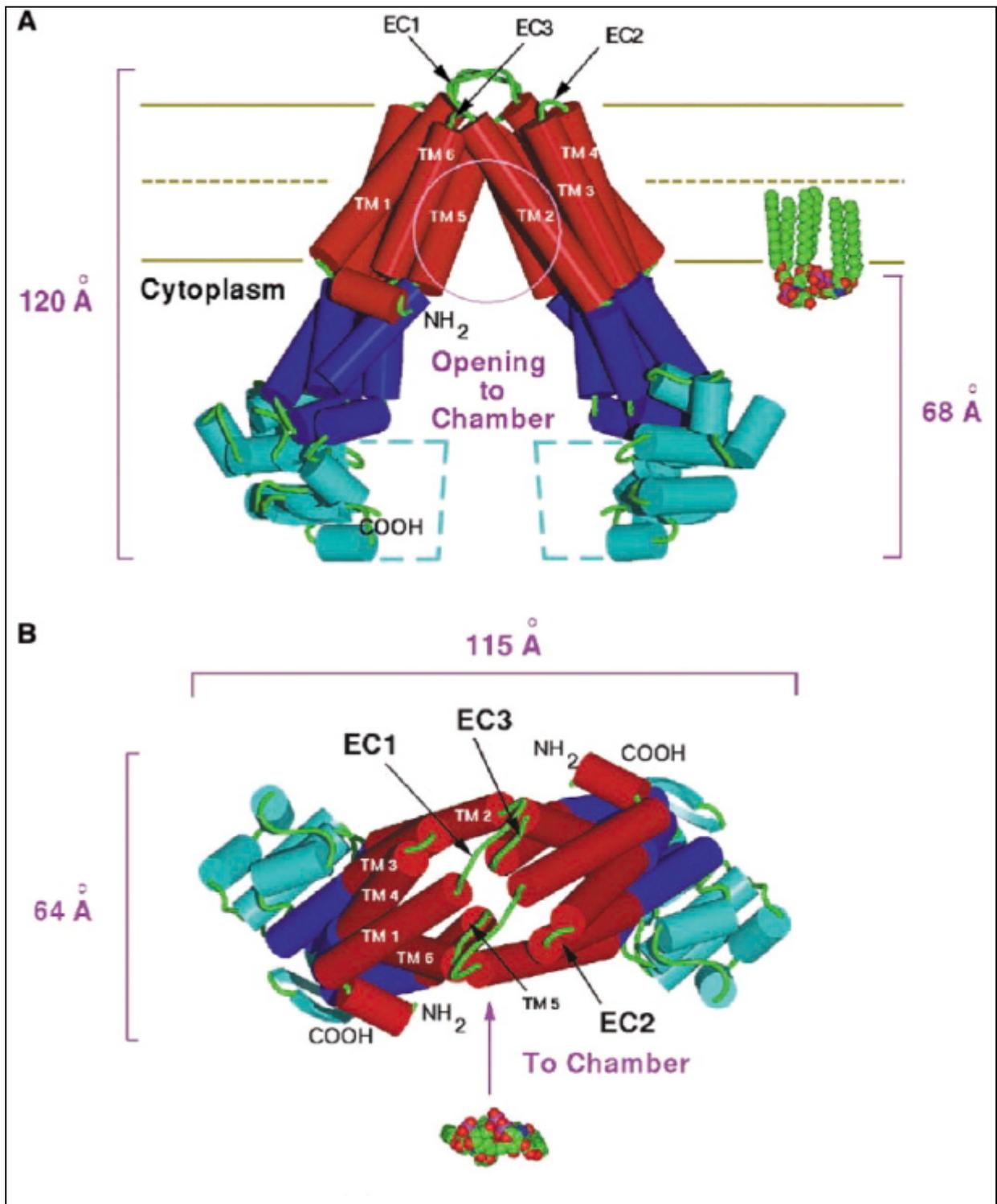
Cependant, ces résultats sont à prendre avec précaution, car toutes ces structures ont été obtenues en absence des domaines transmembranaires. De plus des études biochimiques démontrent qu'il existe une forte coopérativité entre les NBD de différents transporteurs (Senior et Gadsby, 1997 ; Davidson et al., 1996 ; Liu et al., 1997,1999 ; van Veen et al., 2000), indiquant qu'au moins deux NBD fonctionnels doivent interagir avec le complexe entier comprenant les domaines transmembranaires (TMD).

### 3.9.2. Structure complète d'un transporteur ABC

Le 7 septembre de cette année 2001 est parue la première structure complète d'un transporteur ABC (Chang et Roth, 2001). Il s'agit de MsbA d'*Escherichia coli* qui transporte, telle une flippase, les lipides A de la face interne du double feuillet lipidique vers la face extracellulaire où ce lipopolysaccharide (LPS) constitue une partie d'une endotoxine d'*E. coli*.

Cette structure tant attendue révèle de nombreux aspects extrêmement intéressants, malgré la relativement faible résolution de 4,5Å. En premier lieu, elle confirme la structure prédite des transporteurs ABC, à savoir des domaines transmembranaires composés effectivement de 6 hélices  $\alpha$  (dont certaines avaient été correctement prédites dans la structure primaire), et la structure des NBD identique à celle décrite dans le chapitre précédant (la structure dimérique étant non disponible dans ce cristal).

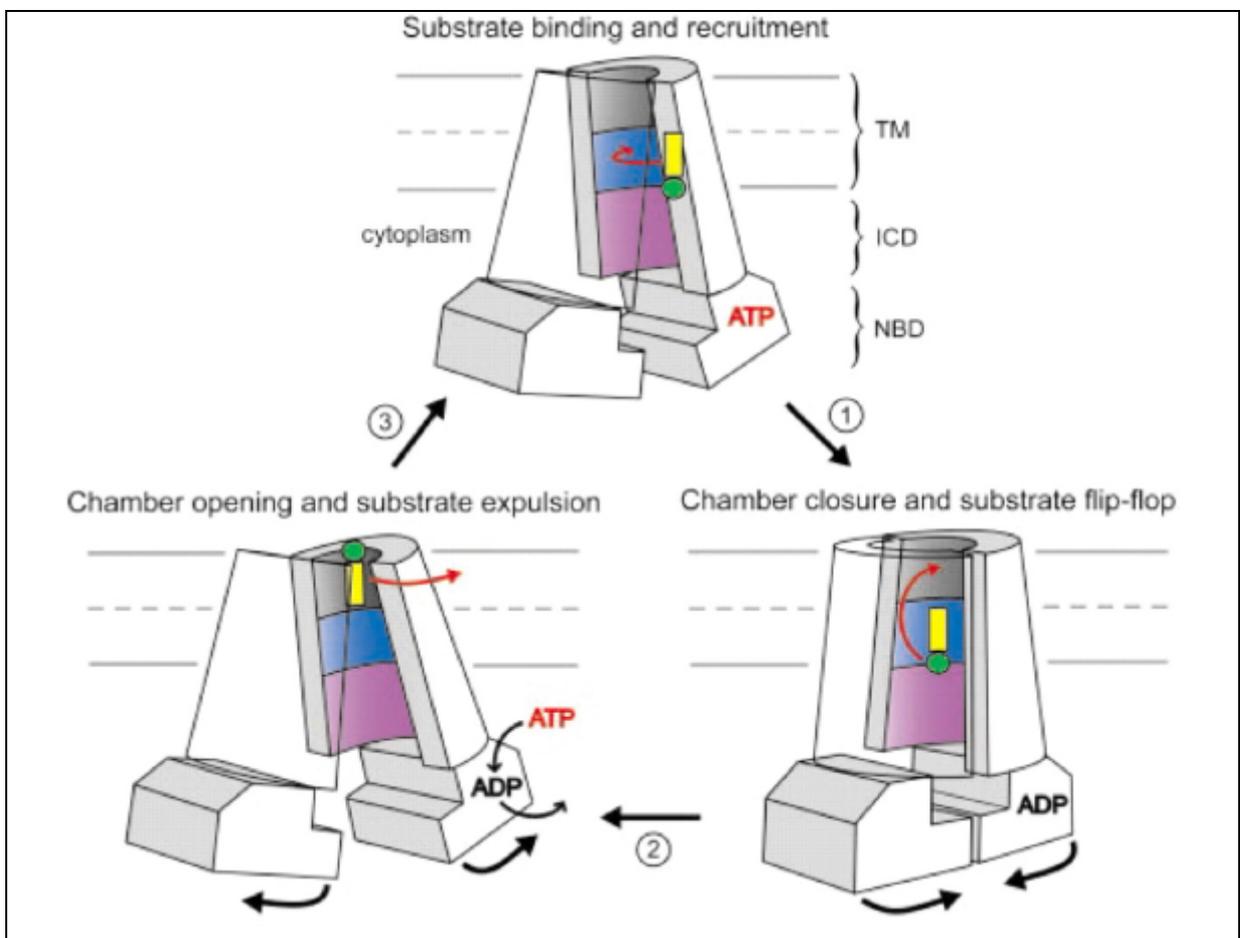
Les hélices sont arrangées de la façon suivante : TM5-TM6-TM1-TM4-TM3-TM2 comme décrit dans la Figure 16.



**Figure 16** : Structure tridimensionnelle de MsbA (Chang et Roth, 2001)

**A)** Vue dans le plan de la membrane avec en rouge les hélices  $\alpha$  transmembranaires (TM1-6), en bleu foncé les domaines intracellulaires (ICD) et en bleu clair les domaines de liaison des nucléotides (NBD). EC1-3 correspondent aux boucles extracellulaires. La molécule représentée à droite de cette structure est le lipide A, substrat de ce transporteur. **B)** Vue de la face extracellulaire.

Cet arrangement ressemble à une main à 6 doigts légèrement repliés de façon concave vers une paume virtuelle. Ainsi, dans l'homodimère cristallisé, cette zone forme la "chambre" dans laquelle le substrat (le lipide A) sera conduit puis exporté, le "pore" du transporteur en quelque sorte. La porte d'entrée se situerait au niveau de chaque interface entre les deux protomères et plus précisément au niveau des hélices  $\alpha$  TM5 et TM6 d'un protomère, et le TM2 de l'autre protomère. Le mécanisme proposé pour le transport des molécules hydrophobes consiste en la fixation du substrat hydrophobe au niveau de l'entrée, provoquant un changement conformationnel qui introduit le lipide A dans la "chambre" et qui se répercute sur les NBD. L'ATP est alors hydrolysé, provoquant le rapprochement des NBD et la fermeture de la chambre comme indiqué dans la Figure 17.



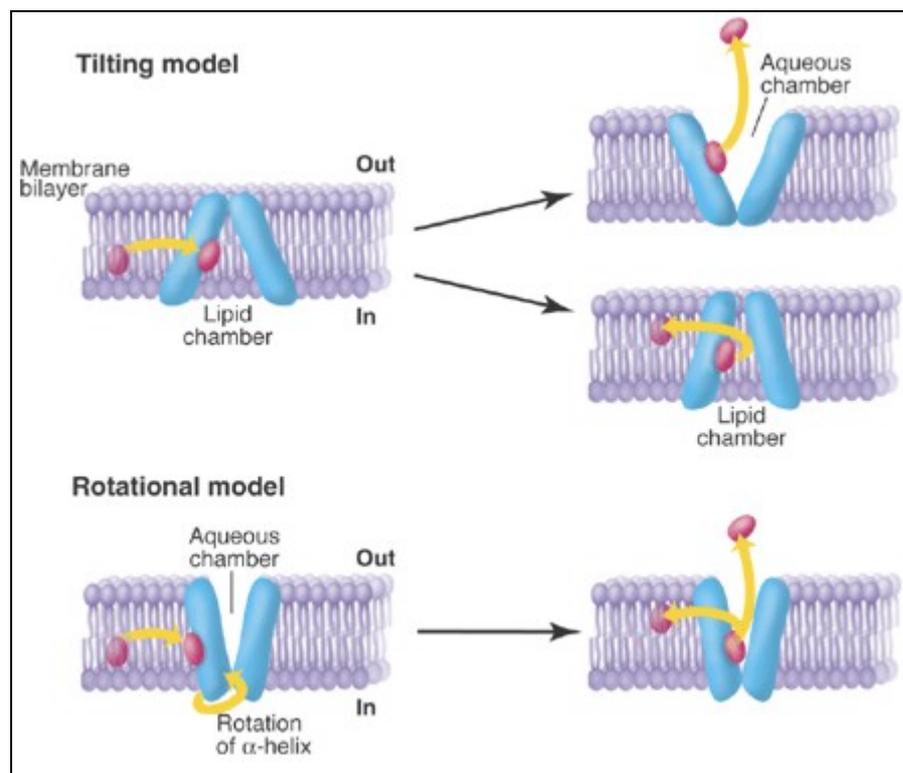
**Figure 17 :** Modèle de transport du lipide A par Eco-MsbA (Chang et Roth, 2001)

**1)** Le substrat présent dans un feuillet lipidique de la membrane entre dans la structure ouverte du transporteur. En bleu la zone électropositive de la chambre et en rose, la zone électro négative. **2)** Une fois le substrat dans la chambre, l'ATP fixé sur les NBDs est hydrolysé, fermant la structure en rapprochant les deux NBD. La tête polaire chargée positivement du lipide A se retrouve dans un environnement défavorable et bascule vers la face extracellulaire. **3)** Le changement conformationnel provoqué par ce transport ouvre la structure, libérant le substrat et l'ADP qui est remplacé par l'ATP en attendant un nouveau cycle.

L'intérieur de la chambre étant fortement chargée électropositivement, le lipide A se retrouve en condition énergétique très défavorable qu'il comble en basculant sa tête polaire chargée également positivement vers la face extracellulaire. De nouveau le transporteur subit un réarrangement structural qui sépare les NBD et libère le substrat. L'ADP est alors remplacé par une molécule d'ATP, laissant le système prêt pour un nouveau cycle de transport.

Dans ce modèle, la force motrice n'est pas l'ATP qui intervient directement dans les réarrangements structuraux, mais l'environnement défavorable provoqué par ce réarrangement. Ce modèle a l'élégance d'expliquer la grande diversité des substrats transportés par les transporteurs ABC MDR, puisque les interactions moléculaires liées au transport ne sont pas directes, mais réparties dans une chambre très électropositive.

Les auteurs mettent en évidence que ce modèle n'est pas applicable à tous les transporteurs ABC, mais semble plausible pour le transport de composés hydrophobes. Higgins et Linton, 2001, proposent d'autres modèles comme schématisé ci-dessous (Figure 18).

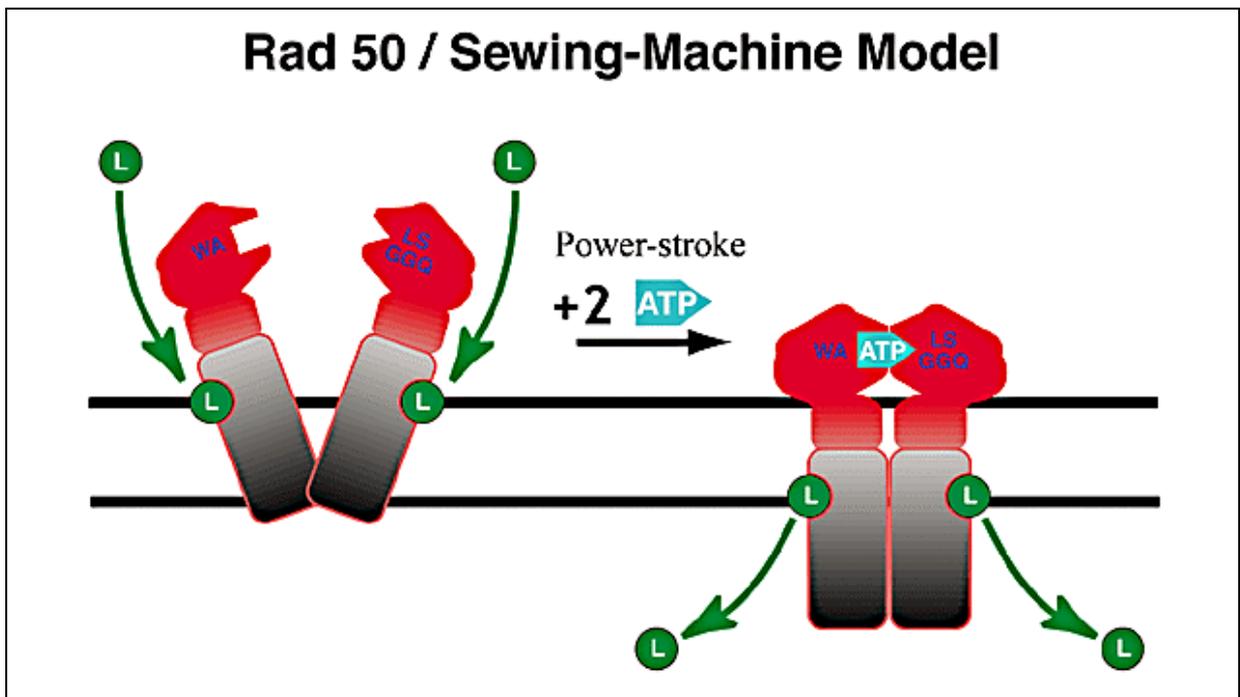


**Figure 18** : Modèles du mécanisme de transport des transporteurs ABC (Higgins et Linton, 2001)

Deux modèles "inclinables" (Tilting) en haut dans lequel le transporteur conserve un angle par rapport à la normale du feuillet lipidique, et un modèle "rotationnel" dans lequel le substrat est transporté par rotation de domaines structuraux.

Ils proposent deux modèles "inclinables" dans lesquels la chambre est remplie de phospholipides membranaires. Dans le premier modèle, le substrat hydrophobe pénètre dans cette chambre, produisant un changement conformationnel ATP-dépendant qui modifie l'environnement en le rendant aqueux et ouvre la chambre sur l'espace extracellulaire dans lequel est libéré le substrat. Le deuxième modèle "inclinable", est une variante dans laquelle la chambre ne s'ouvre pas sur l'extérieur, mais se modifie conformationnellement, induisant le passage du substrat dans le sens du feuillet lipidique interne vers le feuillet externe. Le troisième modèle de Higgins et Linton, appelé modèle "rotationnel", correspond à une rotation de la protéine, après hydrolyse de l'ATP, pour faire entrer le substrat dans la "chambre". Il est ensuite soit libéré dans le milieu extracellulaire, soit réinséré dans la membrane dans le feuillet lipidique externe.

Un dernier modèle original a été tout récemment proposé, le modèle "machine à coudre" (Figure 19) dans lequel le substrat pénétrerait dans la chambre par la face cytoplasmique (soit lipidique, soit cytosolique) ; l'ATP s'hydrolyserait alors provoquant une translation de la structure toute entière des hélices  $\alpha$  transmembranaires qui sont un peu plus longues du côté cytoplasmique. Cette translation ferait ressortir une partie des hélices du côté externe, libérant ainsi la sortie au substrat qui est expulsé dans l'espace extracellulaire ou dans le feuillet lipidique opposé. Les hélices  $\alpha$  transmembranaires reprennent ensuite leur position initiale avec leur excroissance dans le cytoplasme. Le nom de ce modèle provient donc de ce va-et-vient qui ressemble à celui d'une aiguille de machine à coudre (Thomas et Hunt, 2001).



**Figure 19** : Modèle de machine à coudre de Rad50 (Thomas et Hunt, 2001)

Le milieu intracellulaire est dans la partie supérieure du schéma. En rouge les NBD, en gris dégradé les domaines transmembranaires et en sphère verte avec un L, le ligand qui se fixe à l'interface protéine-lipide. Durant le transport, toute la structure effectue un mouvement de va-et-vient à travers la bicouche lipidique.

Cependant ce modèle est critiquable et critiqué par les auteurs sur plusieurs points malgré l'immense travail et les connaissances qu'il nous procure:

1) Les cristaux ont été obtenus en absence de lipides qui sont pourtant un support essentiel pour la structure des parties membranaires de la protéine. Ces conditions de cristallisation pourraient expliquer l'éloignement des NBD, d'un angle variant entre 30 et 40° par rapport à la normale des feuillettes lipidiques. Cet angle n'est peut être pas aussi important en condition *in vivo*

2) Ce modèle ne permet pas d'expliquer le fonctionnement de tous les transporteurs ABC, et notamment ceux qui transportent des substrats hydrophiles. L'exemple extrême étant CFTR qui est un canal ionique, et possède donc un pore laissant passer librement les ions chlorures à une vitesse 10 000 fois plus rapide qu'un mécanisme de transport. Mais il est possible que tous les transporteurs ABC n'aient pas le même mécanisme et que celui ci soit plus proche de celui des transporteurs ABC qui transportent des substrats de même nature

3) La forme homodimérique de MsbA n'est peut être pas la forme active en milieu bactérien, cette hypothèse restera un suspens jusqu'à la mise en évidence de l'activité du dimère par des mesures biochimiques.

Au demeurant, deux autres points importants découlent de cette structure :

1) La présence d'un nouveau domaine dans les transporteurs ABC dénommé ICD (IntraCellular Domain) qui correspond à un prolongement dans l'espace cytoplasmique des hélices  $\alpha$  transmembranaires. Les ICD relient physiquement les domaines transmembranaires aux NBD. Ils sont la charnière conformationnelle entre ces deux domaines aux fonctions interdépendantes. Ils peuvent être le siège de sites de fixation de bloqueurs ou d'activateurs des transporteurs ABC qui influeraient sur ce domaine clé de transduction du signal à travers toute la protéine.

2) La structure met en évidence la zone de jonction entre les deux dimères dont les interactions moléculaires se situent principalement entre les résidus de l'hélice  $\alpha$  TM2 d'un protomère et les résidus de l'hélice  $\alpha$  TM5 du protomère lui faisant face. Cette région a probablement un rôle pour la fixation et l'entrée des substrats dans la "chambre". Les changements conformationnels de cette région sont certainement impliqués dans le mécanisme de transport proprement dit et pourraient être régulés par des agents pharmacologiques mimant des substrats endogènes.

## 4. LES CANAUX $K_{ATP}$

### 4.1. Historique

Les canaux  $K_{ATP}$  ont été mis en évidence en 1983 par Noma lors d'enregistrement de courants potassiques sur des myocytes cardiaques. Lorsque ces cellules étaient traitées avec des cyanides, ou en condition d'hypoxie, les courants potassiques étaient augmentés. Par contre, l'injection dans le cytoplasme d'ATP en concentration supérieures au micromolaire ou d'ADP à plus forte concentration, bloquait ces courants. Par contre l'adénosine 5'-monophosphate n'avait aucun effet inhibiteur sur ces canaux auxquels furent logiquement donnés le nom de canaux potassiques sensibles à l'ATP ( $K_{ATP}$ ). La caractérisation de ces canaux d'un point de vue électrophysiologique révéla également que ces canaux étaient rectifiants entrants.

Peu de temps après, le récepteur des sulfonylurées des cellules  $\beta$  pancréatiques a été proposé pour être le canal  $K_{ATP}$  ou tout au moins une partie intégrante de ces canaux (Sturgess et al., 1985). Il s'ensuivit de nombreuses recherches sur la pharmacologie de ces canaux, démontrant que les sulfonylurées, le glibenclamide par exemple, sont de puissants bloqueurs des canaux  $K_{ATP}$  pancréatiques (Schmid-Antomarchi et al., 1987a,b), et que ceux-ci ont une très forte affinité pour cette classe de molécules (Kramer et al., 1988). Fosset et al., 1988, démontrent également que les sulfonylurées antidiabétiques agissent sur un récepteur de haute affinité lié aux canaux  $K_{ATP}$  cardiaques. Il existe également des activateurs, tels que le diazoxide (Zunkler et al., 1988) et la galanine (de Weille et al., 1988) qui agissent sur les canaux  $K_{ATP}$  pancréatiques.

En 1988, Frances Ashcroft suggéra dans sa revue (Ashcroft, 1988a) d'utiliser cette haute affinité des canaux  $K_{ATP}$  vis-à-vis des sulfonylurées pour les localiser et les isoler. Ce qui fut fait en 1995, date à laquelle Aguilar-Bryan et al. clonèrent le premier récepteur des sulfonylurées : **SUR1** à partir de cellules  $\beta$  pancréatiques de hamster. Ils utilisèrent du glibenclamide marqué à l'iode radioactif pour isoler des fragments de SUR issus de lysats de la protéase V8. Après séquençage peptidique de l'extrémité Nter et de quelques fragments ainsi obtenus, ils produisirent des anticorps spécifiques qui permirent l'immunoprécipitation de SUR, la révélation s'effectuant par photomarquage à la glyburide. Après détermination de la séquence

peptidique de cette protéine isolée, toute une série d'oligonucléotides "dégénérés" est testée par PCR (Polymerase Chain Reaction) sur une banque d'ADNc d'une lignée cellulaire de souris  $\alpha$ TC-6 (glucuganoma- $\alpha$  cell line). Une séquence Nter de 25 résidus fut retrouvée parmi tous les clones et après une deuxième recherche en PCR, deux cadres de lecture (ORF : Open Reading Frame), codant pour une protéine de 1582 acides  $\alpha$  aminés, furent mis en évidence. Le gène de SUR1 était enfin cloné et exprimable dans des cellules de mammifères COSm6 transfectées. De plus, la séquence signature des transporteurs ABC est présente chez SUR1, qui est très homologue à MRP (29% d'identité de séquence), démontrant que cette protéine appartient à la famille des transporteurs ABC. A cette époque, MRP et SUR étaient représentés avec 13 hélices transmembranaires, or nous savons désormais, par des études d'accessibilité de mutants cystéine à des réactifs spécifiques (Cys-mapping) et par insertion d'épitope (epitope-mapping), qu'il s'agit très certainement de protéines à 17 hélices transmembranaires.

En outre, la protéine SUR1 ne transporte pas le potassium, cette fonction est remplie par une autre protéine, uKATP-1, clonée la même année que SUR1, et semblant s'exprimer ubiquitairement chez le rat (Inagaki et al., 1995a). Il s'agit d'un canal potassique rectifiant entrant qui, depuis la normalisation du nom des canaux rectifiants entrants, se nomme **Kir6.1**.

Ainsi, en 1995, les deux sous-unités des canaux potassiques sensibles à l'ATP étaient enfin clonées. Tout naturellement, des isoformes de ces protéines ont été recherchées, à partir des séquences nucléotidiques de SUR1 et Kir6.1, et trouvées dans l'année qui suivit. Le gène de **SUR2** fut isolé par Inagaki et al., 1996, celui de BIR ( $\beta$  cell Inward Rectifier, dorénavant appelé **Kir6.2**) par Inagaki et al., 1995b, et Sakura et al., 1995b, **SUR2B** ayant été découvert par Isomoto et al., 1996.

Depuis cette date, il est possible de travailler sur des canaux recombinants dans des systèmes d'expression hétérologue, dont l'utilisation est beaucoup plus aisée que les tissus natifs qui restent cependant la référence physiologique pour l'étude des canaux.

Les canaux  $K_{ATP}$  ont été le premier exemple de complexe hétéromultimérique composé d'un canal et d'un transporteur ABC (Seino, 1999).

## 4.2. Localisation tissulaire des canaux $K_{ATP}$

Bien avant le clonage des deux sous-unités des canaux  $K_{ATP}$ , de nombreuses équipes de recherche avaient déjà mis en évidence leur présence dans de nombreux tissus, le premier étant bien entendu le muscle cardiaque puisque c'est dans ce tissu que furent découverts les premiers canaux  $K_{ATP}$  (Noma, 1983 ; Kakei et Noma, 1984 ; Trübe et Hescheler, 1984).

Mais le muscle cardiaque n'est pas le seul muscle à exprimer des canaux  $K_{ATP}$ . Ils sont également présents dans la membrane plasmique des muscles squelettiques (Spruce et al., 1985, 1987 ; Vivaudou et al., 1991) et des muscles lisses (Standen et al., 1989 ; Quayle et al., 1997).

En dehors de ces organes contractiles, certaines cellules endocriniennes ont des fonctions régulées par l'activité des canaux  $K_{ATP}$ . Les plus étudiées furent les cellules  $\beta$  pancréatiques dont les canaux  $K_{ATP}$  sont un des maillons de la chaîne de régulation de la sécrétion d'insuline (Ashcroft et al. 1984 ; Cook et Hales, 1984 ; Findlay et al., 1985 ; Rorsman et Trube, 1985). L'hypophyse (Bernardi et al., 1993) et les neurones de la zone cérébrale (Schwanstecher et al., 1994 ; Ashford et al., 1988 ; Spanswick et al., 1997) sont également pourvus de canaux  $K_{ATP}$ . Le rein n'est pas en reste puisque Hunter et Giebisch, 1988, y ont également mis en évidence la présence de ces canaux.

La membrane plasmique n'est pas l'unique siège des canaux  $K_{ATP}$ . En effet, la membrane interne mitochondriale en est également dotée comme le démontrèrent Inoue et al., 1991 et Paucek et al. 1992, puis Szewczyk et al., 1997, qui révélèrent également l'existence d'une petite protéine de 28kDa hautement affine pour la glibenclamide marquée à l'iode<sup>125</sup>, dans la membrane interne des mitochondries.

Tous les canaux cités précédemment ont été découverts dans des tissus de mammifères. Il existe cependant des canaux  $K_{ATP}$  dans les cellules folliculaires de *Xenopus laevis* (Guillemare et al., 1994) qui ne sont pas les seuls animaux "non-mammifères" à les exprimer, puisqu'ils ont également été découverts chez la drosophile (Nasonkin et al., 1999) et certaines grenouilles (Forestier et Vivaudou, 1993a).

Les canaux  $K_{ATP}$  sont donc présents dans un grand nombre de tissus différents, et n'ont certainement pas tous été localisés. A cette diversité de répartition tissulaire, s'associe une diversité de fonctions physiologiques.

### 4.3. Rôles physiologiques

Quel que soit le tissu dans lequel les canaux  $K_{ATP}$  sont exprimés, leur rôle peut être défini globalement de la façon suivante : les canaux  $K_{ATP}$  permettent à la cellule de coupler le potentiel de sa membrane à son activité métabolique, les trois protagonistes étant les ions potassiques pour la modification du potentiel de membrane, et l'ATP et l'ADP comme sondes métaboliques (Weiss et Venkatesh, 1993 ; O'Rourke et al., 1994 ; Djeza et Terzic, 1998).

La modification du potentiel de membrane est la résultante de l'activité des canaux  $K_{ATP}$ , dont les conséquences divergent selon le type cellulaire impliqué. Ainsi dans une liste non-exhaustive des différentes fonctions trouvées à ce jour, nous pouvons citer :

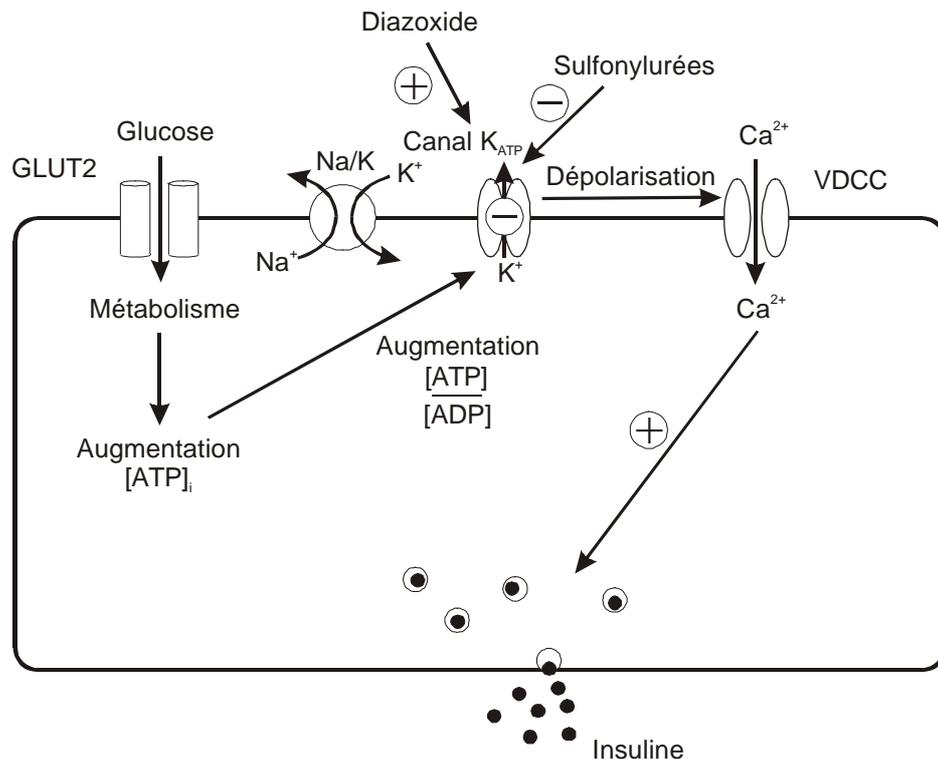
- 1) La cytoprotection contre l'ischémie du muscle cardiaque et du cerveau (Terzic et al., 1995 ; Seino, 1999)
- 2) Le contrôle de l'excitabilité des muscles squelettiques et des neurones (Davies et al., 1991 ; Seino, 1999)
- 3) La régulation du tonus vasculaire (Daut et al., 1990)
- 4) Le recyclage des ions potassiques dans l'épithélium rénal
- 5) Le relargage de neurotransmetteurs (Amoroso et al., 1990)
- 6) La sécrétion d'hormones (Ashcroft, 1996 ; Misler et Giebisch, 1992), le rôle physiologique le mieux connu étant la régulation de la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  pancréatiques (Ashcroft, 1988a ; Cook et al., 1988).

La Figure 20 schématise cette voie de régulation de la sécrétion d'insuline en fonction de la glycémie. Prenons le cas d'une hyperglycémie légère faisant suite à un repas riche en glucides, la concentration sanguine de glucose étant plus importante, le transporteur de glucose GLUT2 (Bell et al., 1990) importera plus de glucose dans la cellule. Suite au catabolisme du glucose (glycolyse, cycle de Krebs, chaîne respiratoire), la concentration d'ATP intracellulaire  $[ATP]_i$  augmente aux dépens de la concentration d'ADP intracellulaire. Le rapport  $[ATP]_i/[ADP]_i$  augmentant, les canaux  $K_{ATP}$  se ferment. Si le nombre de canaux bloqués est suffisamment important (à partir de 5mM de glucose, Ashcroft et al., 1988b) pour induire une dépolarisation de la membrane plasmique au delà d'une certaine valeur seuil, les canaux calciques voltage-dépendants (VDCC : voltage-dependent calcium channel) sont activés (Rorsman et Trube, 1985). Le calcium entrant agit comme un second messenger qui

induit alors l'exocytose des granules d'insuline (Arkhammar et al., 1987). La raison proviendrait de la fixation des ions calciques sur les protéines contractiles du cytosquelette, dont l'activité augmenterait le trafic intracellulaire des granules vers la membrane plasmique.

Les sulfonylurées sont des bloqueurs des canaux  $K_{ATP}$ . Leur action mime une hyperglycémie en provoquant une dépolarisation membranaire *via* les canaux  $K_{ATP}$ . Ils induisent par conséquent une sécrétion d'insuline lors de leur application sur des cellules  $\beta$  pancréatiques, d'où leur action antidiabétique. Malheureusement ces produits agissent également sur les canaux  $K_{ATP}$  d'autres tissus, rendant très délicate leur utilisation thérapeutique.

Ce schéma soulève entre autres un point de polémique actuelle sur la régulation endogène du canal. En effet, en condition "normale", la concentration d'ATP intracellulaire est plusieurs fois supérieure au millimolaire (entre 3 et 6mM), ce qui devrait constamment bloquer les canaux  $K_{ATP}$  ( $IC_{50}=10\mu M$ ) et provoquer la sécrétion permanente d'insuline. Une hypothèse propose que les concentrations submembranaires d'ATP sont moins importantes que dans le cytosol de par les répulsions de charges entre les phospholipides chargés négativement (le phosphatidyl inositol 4,5 biphosphate,  $PIP_2$ , activateur endogène du canal) et l' $ATP^{4-}$ , ou par l'action de nombreuses activités ATPasiques de protéines membranaires qui augmenteraient localement le pool d'ADP (Loussouarn et al., 2001a). Hypothèse renforcée par la mise en évidence de l'activité ATPasique de SUR qui produirait son propre ADP activateur (Zingman et al., 2001).



Copié de Seino (1999). "ATP-sensitive potassium channel: A model of heteromultimeric potassium channel/receptor assemblies". *Ann. Rev. Physiol.* 61: 337-362.

**Figure 20** : Mécanisme de régulation de la sécrétion d'insuline des cellules  $\beta$  pancréatiques en fonction de la glycémie (Seino, 1999).

GLUT2 : transporteur de glucose /  $K_{ATP}$  : canaux potassiques sensible à l'ATP / VDCC : canaux calciques voltage-dépendant / Na/K : pompe sodium-potassium.

#### 4.4. Canalopathie

Ce terme désigne les maladies liées aux canaux ioniques. La maladie génétique la plus fréquente chez des personnes possédant un dysfonctionnement des canaux  $K_{ATP}$ , est l'hypoglycémie hyperinsulinémique infantile (PHHI : familial Persistent Hyperinsulinaemic Hypoglycaemia of Infancy).

Les mutations responsables de cette terrible maladie sont réparties entre les deux sous-unités du canal, SUR1 et Kir6.2. Dans la majorité des cas de mutation empêchent l'activation endogène du canal, provoquant une sécrétion constante d'insuline, et par conséquent un niveau dangereusement bas de glucose dans le sang. Parfois les mutations modifient l'expression de la protéine dans la membrane, rendant inexistants les courants potassiques issus des canaux  $K_{ATP}$ . Cette situation change le potentiel de membrane à une valeur mimant une dépolarisation

permanente qui active les canaux calciques VDCC, et provoque la sécrétion d'insuline en continu.

Pour exemple voici trois mutations fréquemment rencontrées chez des malades souffrant d'hypoglycémie hyperinsulinémique :

- SUR1 G1479R : La Glycine 1479 est située dans la région "linker" ou motif C du NBD2. Ces canaux mutants sont alors inhibés normalement par l'ATP intracellulaire mais deviennent insensibles à toute activation par l'ADP (Nichols et al., 1996).
- SUR1 R1437Q(23)X : cette mutation très fréquente chez les personnes atteintes de PHHI correspond à une mutation d'une guanosine en adénosine. Le cadre de lecture s'en trouve modifié et fait apparaître un codon stop, 23 résidus en aval de la mutation. Les protéines mutantes sont alors délétées du NBD2, entraînant une perte totale de l'activité des canaux  $K_{ATP}$  mutés (Seino, 1999).
- Kir6.2 Y12X : est une mutation non sens qui transforme le codon de la tyrosine en codon stop. Kir6.2 ne s'exprime pas, provoquant une absence totale de courants potassiques régulés par l'ATP (Nestorowicz et al., 1997).

Les ouvreurs sont donc les agents pharmacologiques les mieux adaptés pour le traitement de ces pathologies liées à une mauvaise activation des canaux  $K_{ATP}$  mutés ou partiellement délétés. Malheureusement, ils sont peu nombreux et le seul employé couramment est le diazoxide. Cependant ce composé de la classe des sulfonamides provoque certains effets secondaires mineurs, notamment sur le système cardiovasculaire.

#### **4.5. Propriétés électrophysiologiques**

Suivant le tissu auquel ils appartiennent, les canaux  $K_{ATP}$  ont des conductances et des constantes d'affinité pour l'ATP différentes. Le Tableau 5 en résume les caractéristiques en quelques lignes.

Tissu	Conductance (pS)	Configuration*	K <sub>i</sub> (ATP) (μM)	Référence
Muscle cardiaque	80	inside-out	100	Noma A., 1983
		whole cell	500	Noma A. et Shibasaki T., 1985
Muscle squelettique	42	inside-out	135	Sturgess N.C. et al., 1985
	58	inside-out	40	Forestier C. et Vivaudou M., 1993b
Muscle lisse artériel	135	inside-out	230	Standen N.B. et al., 1989
Cellule β pancréatique humaine	64	inside-out		Ashcroft F.M. et al., 1987
Cellule β pancréatique de rat	75	inside-out		Findlay I. et al., 1985
Neurone cortical	100	inside-out	2000	Ashford M.L.J. et al., 1988

**Tableau 5** : Propriétés électrophysiologiques des canaux K<sub>ATP</sub>.

Les conductances sont obtenues en condition symétrique de potassium à 150mM. A noter que les différences entre les auteurs pour le muscle cardiaque et les muscles squelettiques sont dues à des conditions expérimentales et des espèces différentes.

L'amplitude du courant unitaire des canaux K<sub>ATP</sub> recombinants contenant Kir6.2, est d'environ 3 pA (à un potentiel imposé de -50mV et en condition symétrique de potassium égale à 150mM), et ceux composés de Kir6.1 ont un courant unitaire plus faible égal à 1,7 pA.

Autres caractéristiques ioniques, les canaux K<sub>ATP</sub> sont fortement sélectifs pour le potassium, mais sont également perméables au rubidium Rb<sup>+</sup>. La rectification voltage-dépendante se fait dans le sens du courant entrant des ions potassiques. Elle est principalement due, en condition physiologique, aux polyamines, mais également à un ion Mg<sup>2+</sup> ou à deux ions Na<sup>+</sup> qui bloquent le chemin dans le champ de force voltaï que à environ 30% de la partie interne du canal, les constantes d'inhibition étant K<sub>iMg</sub> = 0,5 mM et K<sub>iNa</sub> = 15 mM à +40 mV (Horie et al., 1987).

L'ATP agit sur l'activité du canal, non pas par encombrement ou réduction de l'amplitude du courant unitaire, mais en réduisant le temps d'ouverture moyen et la fréquence d'ouverture par bouffée (burst).

---

\* : cf. Matériels et Méthodes / Patch Clamp

## 4.6. Régulation

### 4.6.1. Régulateurs physiologiques

L'activité du canal est sous le contrôle, non voltage-dépendant, d'une régulation complexe par l'ATP et l'ADP intracellulaire (Ashcroft et al., 1984 ; Rorsman et Trube, 1985 ; Mislér et al., 1986).

Sous sa forme libre, l'**ATP** réduit la probabilité d'ouverture des canaux, qui sont tous fermés dès que la concentration d'ATP atteint 1mM. Dans ce mécanisme de régulation, l'ATP n'est qu'un effecteur, il ne joue donc pas un rôle énergétique comme le prouve l'inhibition des canaux  $K_{ATP}$  par ses analogues non hydrolysables.

L'**ADP** libre inhibe moins efficacement le canal avec un  $K_i$  trois fois plus grand que celui de l'ATP (100 $\mu$ M). Le Mg-ADP à faible concentration antagonise l'effet bloqueur de l'ATP, en se liant sur un autre site (Ueda et al., 1997). Mais à des concentrations supérieures à 3mM, Mg-ADP a un effet bloqueur dominant, d'où l'hypothèse de sites activateurs saturables de plus forte affinité que les sites inhibiteurs.

Les **autres nucléotides** engendrent eux aussi une inhibition du canal, mais celle-ci est d'autant plus faible que la longueur de la chaîne des phosphates diminue. Ainsi, les inhibiteurs nucléotidiques sont classés, comme suit, par ordre de pouvoir inhibiteur décroissant : ATP>ADP>AMP>Adénosine (Ribalet et Ciani, 1987 ; Lederer et Nichols, 1989). La substitution du ribose par une forme réduite (2-déoxyribose) ou oxydée (ribose 2', 3' dialdéhyde) diminue l'effet inhibiteur. De même, la substitution de l'adénine par une autre base purique ou pyrimidique réduit de manière substantielle le pouvoir inhibiteur sur le canal. Ainsi, le GTP, l'ITP, le CTP, l'UTP (à 1mM) ne produisent que de 40 à 80% d'inhibition (Spruce et al., 1987).

Il est à noter que pour les canaux  $K_{ATP}$  du muscle squelettique d'amphibien, le **pH** est également un régulateur endogène. En effet, Vivaudou et Forestier ont démontré que les protons activent le canal en diminuant allostériquement l'inhibition par l'ATP (Vivaudou et Forestier, 1995).

### 4.6.2. Pharmacologie des canaux $K_{ATP}$

Les bloqueurs : les **sulfonylurées** (antibiotiques, hypoglycémisants), utilisés dans le traitement du diabète de type II (non insulino-dépendant), sont des bloqueurs spécifiques des canaux  $K_{ATP}$  (Gopalakrishnan et al., 1993, Kakei et Noma, 1984,

Trube et al., 1986). Ces agents, dont le plus puissant est la glibenclamide ( $K_i = 5-30\text{nM}$ ), manquent de spécificité tissulaire bien qu'ils aient une plus forte affinité pour le canal pancréatique. Dans le coeur, ils antagonisent le mécanisme de cardio-protection et créent de petits troubles cardio-vasculaires compliquant légèrement leur utilisation thérapeutique (Panten et al., 1996).

Les ouvreurs : de nombreux composés pharmacologiques de structures diverses (benzopyranes, dérivés guanidine, sulfonamides...) sont connus pour augmenter l'activité des canaux  $K_{ATP}$ . Ces activateurs ont des actions antihypertensives et vasodilatatrices sur les cellules du muscle lisse, provoquant une hypertrophie cardiaque (Atwal K. S., 1994). Le sulfonamide diazoxide est actif spécifiquement sur le canal pancréatique (Gribble et al., 1997a), tandis que le cromakalim, de la famille des benzopyranes, n'active que les canaux cardiaques et musculaires. Ces activateurs agiraient par diminution de l'affinité apparente du canal pour l'ATP, augmentant ainsi la probabilité d'ouverture du canal sans en modifier la conductance.

#### **4.7. Kir6.x**

Les membres de la sous-famille des canaux rectifiants entrants Kir6 sont des rectifiants faibles qui sont au nombre de deux, Kir6.1 et Kir6.2 dont voici les caractéristiques.

##### **4.7.1. Kir6.1**

Kir6.1 a été trouvé à partir d'une sonde ADNc de Kir3.1 et cloné à partir d'îlots pancréatiques de rat sous le nom initial de uKATP-1. Sa taille est de 424 acides aminés. De par sa relativement faible homologie avec les autres canaux Kir (40-50% d'identité de séquence), il fut le membre fondateur d'une nouvelle sous-famille de canaux Kir : Kir6.x.

L'analyse de sa séquence primaire révèle sans surprise la présence de la séquence signature des canaux potassiques (GFG dans ce cas, GYG en général) dans l'hélice H5. De plus, 2 sites potentiels de phosphorylation par la protéine kinase A (PKA) et 7 par la PKC sont présents dans les parties cytoplasmiques du canal.

Chez l'humain, le gène KCNJ8 codant pour Kir6.1 a été localisé au niveau du chromosome 12 : 12p11.23.

Par prédiction de structure et homologie de séquence avec le canal bactérien KcsA, la structure de Kir6.1 est communément acceptée comme un homotétramère

en forme de tipi inversé (cf. § structure des canaux potassiques, page 43) avec pour piliers structurants le pore, les quatre hélices M2 entourées des hélices M1, la petite hélice H5 formant l'entonnoir qui conduit les ions potassiques vers le filtre de sélectivité.

Son expression semble ubiquitaire, mais elle n'a pu être mise en évidence dans les cellules sécrétrices d'insuline en culture (HIT-T15, RINm5F, MIN6).

Les canaux  $K_{ATP}$  composés de Kir6.1 sont également inhibés par l'ATP (Lu et Halvorsen, 1997). Ils sont également activés par le pinacidil dans les myocytes cardiaques *via* le récepteur des sulfonyles.

L'expression génomique de Kir6.1 est régulée de façon réciproque avec Kir6.2 sous certaines conditions de stress cellulaire. En effet, lorsque le cœur est en hypoxie, la sous-unité Kir6.1 est surexprimée, tandis que Kir6.2 est partiellement réprimée, modifiant ainsi la composition des canaux  $K_{ATP}$  cardiaques et donc leur régulation et leurs propriétés électrophysiologiques pour s'adapter au stress hypoxique (Melamed-Frank et al., 2001).

## 4.7.2. Kir6.2

### 4.7.2.1. Taille, séquence et structure

Son premier nom fut BIR ( $\beta$ -cell Inward Rectifier) lorsqu'il fut trouvé dans les cellules murines MIN6 à l'aide d'une sonde cDNA déterminée à partir de la séquence de Kir6.1.

Sa taille est moins importante de 34 résidus que celle de Kir6.1, soit un enchaînement de 390 acides  $\alpha$  aminés au total. L'homologie entre ces deux protéines est très forte (71% d'identité de séquence) bien que les gènes soient distincts. En effet Kir6.2 est localisé sur le chromosome humain 11 (12 pour Kir6.1) à environ 4,5 kb en aval du gène *SUR1*. Son expression est élevée dans les lignées cellulaires HIT-T15, MIN6,  $\alpha$ TC-6 (sécrétrice de glucagon), et faible dans le cœur, les muscles squelettiques, le cerveau et les cellules RINm5F.

La prédiction de structure de Kir6.2 est similaire à celle de Kir6.1 avec la même orientation des deux hélices  $\alpha$  et de la boucle H5 contenant la séquence consensus ou filtre de sélectivité GFG. Sur la base des données cristallographiques de KcsA, des études de modélisation moléculaire proposent un modèle structural de Kir6.2 et une simulation dynamique de quelques nanosecondes (Capener et al., 2000).

Le mécanisme de rectification, due principalement aux polyamines et cations divalents, implique l'asparagine 160 de l'hélice  $\alpha$  M2 qui, lorsqu'elle est mutée en aspartate ou en glutamate, induit une rectification très forte, alors qu'elle est identique pour les mutants N160A et N160Q (Shyng et al., 1997).

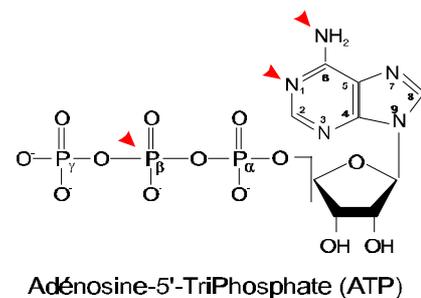
#### 4.7.2.2. Régulation

Les parties cytoplasmiques contiennent 2 sites potentiels de phosphorylation par PKA et 5 pour PKC. La sérine 372 avait été proposée pour être phosphorylée par PKA (Beguin et al., 1999) mais Lin et al., 2000, révèlent que l'activation du canal par cette protéine kinase est préférentiellement due à la phosphorylation de la thréonine 224. Ce résultat est renforcé par la baisse de la sensibilité à l'ATP du mutant T224D qui mime partiellement un état phosphorylé. Light et al., 2000, ont mis en évidence que PKC phosphoryle la Thr180, et induit l'activation du canal. Cependant cette phosphorylation n'est pas due à l'hydrolyse de l'ATP fixé sur son site inhibiteur.

Kir6.2 est beaucoup plus étudié que Kir6.1, de par son importance dans la composition des canaux  $K_{ATP}$  pancréatiques. De fait, beaucoup d'expériences de cartographie du pore et du vestibule ont été réalisées par mutations ponctuelles en cystéine pour mettre en évidence la flexibilité du pore durant le transport (Loussouarn et al., 2001b). Ces expériences ont été facilitées par la découverte surprenante et très utile, de canaux Kir6.2 tronqués des 26 ou 36 résidus C-terminaux qui s'expriment sans la présence du récepteur des sulfonylurées (Tucker et al., 1997). Ces canaux tronqués exprimés seuls dans la membrane plasmique restent cependant sensibles à l'ATP, mais ne sont plus activés par MgADP, ni par les ouvreurs. En absence de la sous-unité SUR, l'affinité apparente pour l'ATP diminue fortement, le  $K_i$  étant 10 fois plus important ( $\sim 100\mu\text{M}$ ) que pour les canaux  $K_{ATP}$  complets ( $\sim 10\mu\text{M}$ ). Gribble et al., 1998a, ont démontré que le  $\text{MgATP}^{2-}$  et l' $\text{ATP}^{4-}$  sont aussi efficaces pour inhiber les canaux Kir6.2 tronqués. De plus ils mettent en évidence que MgATP active les canaux  $K_{ATP}$  en se fixant sur les NBDs, d'où l'hypothèse qu'il pourrait être hydrolysé en MgADP qui est également un activateur des canaux  $K_{ATP}$ . Le magnésium n'est pas essentiel pour l'action inhibitrice de l'ATP sur Kir6.2 (Gribble et al., 1998a) et des analogues non-hydrolysables : AMP-PNP (adénylylimidodiphosphate) et l'AMP-PCP (adenylmethylenediphosphate), ont également un fort pouvoir inhibiteur sur ces canaux, confirmant l'absence d'hydrolyse de l'ATP dans le processus d'inhibition du canal (Cook et Hales, 1984 ; Kakei et al.

1985 ; Spruce et al., 1985,1987 ; Ashcroft et Kakei, 1989). Le  $\text{MgATP}^{2-}$  semble avoir un pouvoir inhibiteur sur Kir6.2 plus faible que celui de  $\text{ATP}^{4-}$ , mais il n'en est rien car Gribble et al., 1998a, ont démontré que le  $\text{MgATP}^{2-}$  a la même constante d'inhibition  $K_i$  que l' $\text{ATP}^{4-}$  sur les canaux Kir6.2 tronqués. La différence observée sur les canaux  $K_{\text{ATP}}$  complets est due à l'effet activateur du MgATP lorsqu'il se fixe sur les NBDs, diminuant ainsi la constante d'inhibition apparente pour l'ATP lié au magnésium. Les autres nucléotides adénylés sont d'autant moins efficaces pour inhiber Kir6.2 que leur chaîne polyphosphate est courte (pouvoir inhibiteur de l'ATP>ADP>AMP). Le ribose est également important, puisque sa réduction en 2-déoxy-ATP ou son oxydation en ATP-2,3-dialdéhyde diminue fortement l'efficacité d'inhibition du canal par l'ATP (Spruce et al., 1987). Les nucléotides non-adénylés peuvent inhiber Kir6.2, mais avec une affinité 10 fois inférieure à celle de l'ATP. Ils peuvent être classés de la façon suivante en fonction de leur effet inhibiteur observé pour une concentration de 1mM : GTP>ITP>XTP>CTP>UTP. Des nucléotides particuliers de la famille des dinucléotides polyphosphates (diadénosine tetra-, penta- et hexaphosphate) bloquent également les canaux  $K_{\text{ATP}}$  (Jovanovic et Terzic, 1995) en agissant directement sur Kir6.2 (Tucker et al., 1998). Ces alarmones jouent un rôle dans la signalisation d'un état de stress (ischémie, hypoxie...), *via* notamment le récepteur des sulfonilurées (Jovanovic et al., 1998a,b).

Le coefficient de Hill pour l'ATP vis-à-vis de Kir6.2 est proche de 1, ce qui signifie qu'une molécule d'ATP se fixe sur une sous-unité Kir6.2. Le site inhibiteur a été localisé sur les deux parties cytoplasmiques de Kir6.2 dans la région proximale des hélices  $\alpha$  M1 et M2 (Tucker et al., 1998). Les mêmes auteurs ont également localisé les atomes de la molécule d'ATP essentiels à sa fixation, à savoir N-1 et/ou NH-6 et le phosphate  $\beta$ . La position 8 est également impliquée dans le bon positionnement de la molécule d'ATP dans son site puisque Kir6.2 a plus d'affinité pour une molécule d'ATP photoactivable contenant le groupement azido à l'extrémité de la chaîne de phosphate ([ $\gamma$ -(32)P]ATP-[ $\gamma$ ]4-azidoanilide) (Tanabe et al., 2000), que pour le 8-azido-ATP (Tanabe et al., 1999). Ces résultats confirment que R50 et K185 sont intimement impliqués dans la fixation des molécules d'ATP.



D'autres effecteurs agissent directement sur différents sites des domaines cytoplasmiques Nter et Cter de Kir6.2 (Jones et al., 2001), tels que les protéines G (Wada et al., 2000), les protons (Forestier et al., 1993 ; Baukowitz et al., 1999) et des sulfonylurées (Gros et al., 1999).

Concernant l'expression isolée de Kir6.2 tronqué, une magnifique étude a été réalisée par Zerangue et al., 1999, pour comprendre cette capacité d'expression sans le récepteur des sulfonylurées. Ils mettent en évidence la présence d'un motif RKR qui est un nouveau signal de rétention de protéines dans le réticulum endoplasmique. Ce signal est non seulement présent dans les 26 résidus C-terminaux, mais également dans le récepteur des sulfonylurées. Le contrôle de la stœchiométrie octamérique des canaux  $K_{ATP}$  se fait donc par masquage inter-sous-unités de cette séquence RKR. Un seul monomère manquant est suffisant pour démasquer une séquence signal et empêcher l'expression du complexe vers la membrane plasmique.

Les axes de recherche actuels sont orientés vers (i) le mécanisme d'inhibition par l'ATP, (ii) la localisation des différentes portes supposées et leur mécanisme d'action, (iii) les déterminants moléculaires de la rectification, (iv) la modélisation moléculaire et dynamique de Kir6.2 lors du passage des ions  $K^+$ , (v) la recherche de partenaires éventuels, (vi) les interactions moléculaires avec la sous-unité SUR.

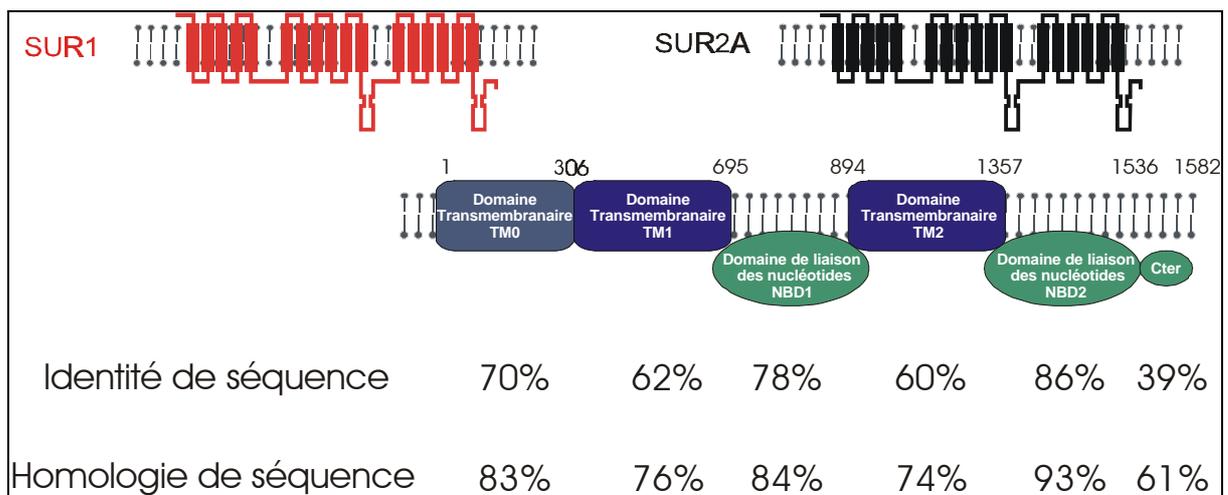
Dans cette dernière optique, plusieurs preuves, en plus du motif RKR, indiquent que la région Cter de Kir6.2 interagit avec la sous-unité SUR (Lorenz et al., 1998 ; Lorenz et Terzic, 1999), mais c'est également le cas avec la région Nter (Reimann et al., 1999). Les résidus de SUR interagissant avec Kir6.2, ne sont pas encore localisés.

#### **4.8. SUR**

Le récepteur des sulfonylurées est en quelque sorte la sous-unité régulatrice du canal  $K_{ATP}$ , bien que le site principal d'inhibition par l'ATP soit sur la sous-unité Kir6.2. En effet, SUR est la cible de l'activateur endogène MgADP et de la majorité des agents pharmacologiques.

Comme cité précédemment, SUR est un transporteur ABC de la sous-famille MRP/CFTR, et comprend 3 membres actuellement connus : SUR1, SUR2A et SUR2B. SUR2A et SUR2B sont codés par un même gène de 39 exons dont les deux derniers sont dénommés 38A et 38B car sujets à un épissage alternatif qui produira

respectivement SUR2A et SUR2B. L'homologie entre ces deux protéines est donc très élevée. Elle l'est également avec l'isoforme SUR1 avec 68% d'identité de séquence entre SUR1 et SUR2A (Inagaki et al., 1996). Leur structure ressemble à celle de MRP avec un domaine transmembranaire supplémentaire de 5 hélices  $\alpha$  en Nter : TMD0 (Figure 21) (Tusnadi et al., 1997). MRP est le transporteur ABC le plus homologue de SUR avec 30% d'identité de séquence sur la globalité de la protéine, et environ 50% d'identité entre les NBD de SUR et de MRP. Le domaine le moins conservé étant le TMD0 avec seulement 12% d'identité, contre environ 25% entre les TMD1 et entre les TMD2 de chaque protéine.



**Figure 21** : Pourcentage d'identité et d'homologie de séquence entre SUR1 et SUR2A pour chaque domaine structural.

Malgré leur forte homologie, les différentes isoformes ont des régulations et des sensibilités différentes vis-à-vis des nucléotides, des bloqueurs et des ouvreurs. De plus leur localisation tissulaire est différente selon les isoformes, induisant souvent des réactions secondaires lors de traitements avec ces molécules pourtant porteuses d'espoir.

#### 4.8.1. Taille, gènes, sites consensus

##### 4.8.1.1. SUR1

SUR1 est le récepteur des sulfonylurées des canaux  $K_{ATP}$  pancréatiques. Pour un poids moléculaire de 177kDa, SUR1 est composé de 1582 résidus chez le hamster et de 1581 chez le rat avec 96% d'identité de séquence entre les deux.

Sa localisation chromosomique chez l'humain est située en aval du gène de Kir6.2 (KCNJ11) sur le chromosome 11 (11p15.1). SUR1 comprend 39 exons dont

l'analyse de séquence fait apparaître plusieurs sites consensus à commencer par 2 sites de glycosylation, un en Nter et un entre les hélices transmembranaires 7 et 8. Sont présents également des sites potentiels de phosphorylation par PKA, 3 chez le rat et 4 chez l'humain et le hamster, ainsi qu'un nombre très important de sites potentiels de phosphorylation par PKC.

#### 4.8.1.2. SUR2A

SUR2A a été trouvé à partir d'une sonde ADNc de SUR1, principalement dans le cœur et les différents types de muscles.

Bien que son homologie de séquence soit importante avec un pourcentage d'identité de 68%, SUR2A est codé par un gène distinct situé sur le chromosome 12 (12p11.12). La protéine est plus courte que SUR1 principalement à cause de l'absence de l'exon 18 de SUR1 dans le gène SUR2. La taille de SUR2A est donc de 1545 résidus pour un poids moléculaire de 174kDa.

SUR2A possède un site de glycosylation supplémentaire, soit 3 au total : un en Nter, et deux entre les hélices 7 et 8. Le nombre de sites potentiels de phosphorylation par PKA est de 2, tandis qu'il existe un nombre important de sites potentiellement phosphorylables par PKC. Cependant aucune phosphorylation de SUR n'a été mise en évidence à l'heure actuelle.

#### 4.8.1.3. SUR2B

SUR2B est issu du même gène que SUR2A, seul l'épissage alternatif de l'avant-dernier (exon 38A) différencie SUR2B de SUR2A. L'exon 38 code pour 42 résidus dont 24 sont différents entre les deux isoformes, et seulement 12 différents entre SUR1 et SUR2B. Ces quelques résidus sont suffisants pour modifier la sensibilité des isoformes à différents agents pharmacologiques. Ainsi SUR2B a les propriétés pharmacologiques de SUR1 et de SUR2A, comme cela est décrit ci-après.

SUR2B semble ubiquitaire dans l'organisme des mammifères, mais comme pour SUR1 et SUR2A, il est exprimé de façon préférentielle avec Kir6.1 ou Kir6.2 suivant les tissus.

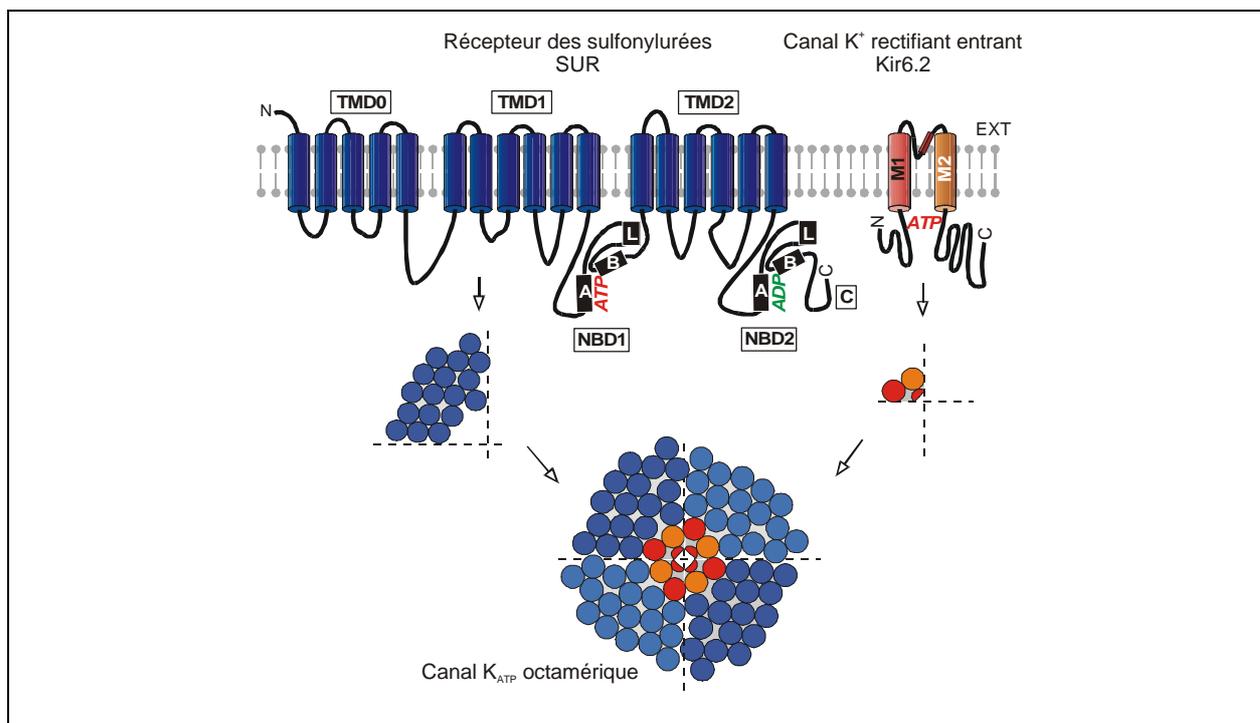
### **4.9. Le complexe octamérique**

Contrairement aux autres canaux Kir, la transfection de l'ADNc de Kir6.2 dans les cellules COS-1, HEK239 ou les ovocytes de *Xénope*, ne permet pas d'observer des

courants potassiques. Il en est de même avec les différentes isoformes du récepteur des sulfonyleurées. Seule la co-injection des ADNc ou des ARNc dans ces cellules permet de masquer le signal RKR de rétention des sous-unités dans le réticulum endoplasmique (comme décrit ci-dessus) et de laisser le canal complet s'exporter vers la membrane plasmique.

La stœchiométrie fut mise en évidence par plusieurs expériences aux principes différents tels que la co-purification des sous-unités, la co-immunoprécipitation ou encore l'utilisation de protéines de fusion. Ainsi Clement et al., 1997, ont utilisé la première technique en co-purifiant Kir6.2 avec SUR1 glycosylé ou marqué avec des hexahistidines sur des colonnes d'agglutinine de germe de blé ou des colonnes de nickel, respectivement. La révélation des bandes par le marquage spécifique de SUR1, à l'aide de  $^{125}\text{I}$ -glibenclamide, démontra que la majorité des sous-unités Kir6.2 (45kDa) était associée à SUR1 (150-170kDa) et que le complexe le plus gros observé en gel natif était de 950kDa. Ceci équivaut à l'association d'environ 4 sous-unités Kir6.2 avec 4 sous-unités SUR1. Ce résultat a été confirmé par des expériences de co-immunoprécipitation utilisant un anticorps anti-Kir6.2 (Lorenz et al., 1998) qui révélèrent des bandes de poids moléculaires correspondant à cette stœchiométrie. La dernière technique qui utilise des protéines de fusion avait déjà été employée pour l'étude des complexes des canaux Kv et autres canaux Kir (Liman et al., 1992 ; Yang et al., 1995). Elle fut appliquée aux canaux  $K_{\text{ATP}}$  également par Clement et al., 1997, qui créèrent une protéine de fusion composée de une sous-unité de SUR1 associée physiquement à deux sous-unités de Kir6.2. Les canaux sont alors fonctionnels mais le flux de  $^{86}\text{Rb}^+$  et leur sensibilité à l'ATP sont plus faibles que les canaux de type sauvage. Cependant, ces caractéristiques redeviennent "normales" lorsque des sous-unités monomériques de SUR1 sont co-exprimées avec les protéines de fusion.

Toutes ces expériences confirment la stœchiométrie des canaux  $K_{\text{ATP}}$  unanimement acceptée sous la forme 4:4 (Kir6.x:SUR) (Figure 22).



**Figure 22** : Architecture supposée des canaux potassiques sensibles à l'ATP (K<sub>ATP</sub>)

SUR : Récepteur des sulfonylurées / Kir : canal potassique rectifiant entrant / TMD : domaine transmembranaire / NBD : domaine de liaison des nucléotides / C : domaine C terminal / A et B : séquence walker A et B / L : séquence linker

L'association de l'homotétramère de kir6.2 avec l'homotétramère de SUR aurait lieu physiquement entre les domaines transmembranaires et l'extrémité en Cter de SUR, avec l'hélice M2 de Kir6.2 (Lorenz et Terzic, 1999).

Tous les complexes entre les sous-unités Kir et les sous-unité SUR sont possibles dans des systèmes d'expression hétérologues. Cependant, tous n'ont pas une signification physiologique. A l'heure actuelle, seuls les canaux décrits dans la Figure 23 semblent être exprimés dans les différents tissus de mammifères.

Type de canal K <sub>ATP</sub>	sous-unité Kir	sous-unité SUR	références
Cellule β pancréatique	Kir6.2	SUR1	Alekseev et al., 1997 Inagaki et al., 1995b Sakura et al., 1995a
muscle squelettique et cardiaque	Kir6.2	SUR2A	Inagaki et al., 1996
muscle lisse	Kir6.2	SUR2B	Okuyama et al., 1998
muscle lisse vasculaire	Kir6.1	SUR2B	Isomoto et al., 1996 Yamada et al., 1997

**Figure 23** : Composition des différents canaux K<sub>ATP</sub> des tissus de mammifères (Seino, 1999)

#### 4.9.1. Kir6.2 + SUR1

Les caractéristiques des canaux recombinants sont identiques à celles des canaux natifs (Cook et Hales, 1984, Findlay et al., 1985, Rorsman et Trube, 1985) à

savoir (i) une conductance de 76pS en condition symétrique de potassium à 140mM, (ii) une concentration de demi-inhibition ( $K_i$ ) par l'ATP avoisinant 10 $\mu$ M, (iii) et sur le plan de la pharmacologie, un blocage par la glibenclamide et une activation hautement spécifique par le diazoxide uniquement.

#### **4.9.2. Kir6.2 + SUR2A**

Les canaux recombinants de type cardiaque et musculaire ont les mêmes propriétés que les canaux natifs : (i) 80 pS, (ii)  $K_{i\text{ ATP}} = 10\text{-}100\mu\text{M}$  suivant les auteurs. La seule différence notable entre les canaux recombinants et les canaux natifs est que (iii) ces canaux sont inhibés par la glibenclamide et des analogues non-hydrolysables de l'ATP, et sont activés par de nombreux ouvreurs potassiques tels que le cromakalim, le pinacidil, ... mais semblent insensibles au diazoxide (Gribble et al., 1998b).

Trois caractéristiques séparent les canaux pancréatiques (SUR1) des canaux cardiaques et squelettiques (SUR2A), (i) l'action spécifique des ouvreurs, (ii) la différence de sensibilité à la glibenclamide qui est 500 fois plus faible pour SUR2A + Kir6.2 exprimé dans les ovocytes de xénope, (iii) les durées des bouffées (burst) et des intervalles inter-bouffées qui sont plus longues dans le cas de SUR2A.

#### **4.9.3. KIR6.2 + SUR2B**

SUR2B étant l'isoforme qui a la plus forte homologie avec les deux autres isoformes SUR1 et SUR2A, ses caractéristiques se situent à l'interface entre ces deux protéines. Ainsi sa conductance est de 80pS, sa constante de demi-inhibition par l'ATP est de 68 $\mu$ M et sa pharmacologie est une combinaison de celle de SUR1 et de SUR2A puisque les canaux des muscles lisses sont bloqués par le tolbutamide et la glibenclamide à des concentrations plus faibles que pour SUR2A, et donc plus proche de SUR1, et ils sont activés à la fois par les ouvreurs potassiques activant SUR2A mais également par le diazoxide, activateur spécifique de SUR1. L'extrémité C-terminale de 42 résidus qui différencie SUR2B de SUR2A est par conséquent impliquée dans l'activation des canaux  $K_{\text{ATP}}$  par le diazoxide.

#### **4.9.4. Kir6.1 + SUR1**

Ces canaux ont été exprimés dans la lignée cellulaire d'origine humaine HEK239, mais n'ont pas été mis en évidence à l'état natif. L'analyse de leurs propriétés

pharmacologiques révèle que SUR1 confère à ces canaux la sensibilité à l'ATP, au sulfonylurées et au diazoxide (Clement et al., 1997 ; Ammala et al., 1996 ; Gribble et al., 1997b). L'activité de Kir6.1 nécessite l'association avec SUR ou un autre modulateur endogène.

#### **4.9.5. Kir6.1 + SUR2B**

Ces canaux sont très particuliers puisque Kir6.1 leur confère la capacité d'être activés par l'ATP à faible concentration, entre 1 et 100 $\mu$ M, et d'être inhibés à des concentrations supérieures. Inversement, le GTP active ces canaux à des concentrations supérieures à 100 $\mu$ M et les inhibe entre 1 $\mu$ M et 100 $\mu$ M. La sous-unité SUR2B leur confère, quant à elle, la sensibilité aux bloqueurs et ouvreurs potassiques tels que le pinacidil et le nicorandil. L'UDP et le GDP stimulent également ces canaux qui ressemblent alors beaucoup plus aux canaux  $K_{NDP}$  (canaux potassiques sensibles aux nucléotides di-phosphates) des muscles lisses vasculaires qu'aux canaux  $K_{ATP}$  classiques (Seino, 1999).

A noter leur très faible conductance, 33pS, mesurée en présence de pinacidil.

### **4.10. Régulation du canal par la sous-unité SUR**

L'association physique de Kir6.2 avec SUR1 suggère que SUR contrôle l'activité du canal directement par une interaction protéine-protéine. Le transport d'une molécule par SUR, comme le font les autres transporteurs ABC, pourrait induire un effet indirect sur le canal.

A l'heure actuelle, le ou les substrats de SUR ne sont pas connus. Nous ne savons même pas si cette protéine a une activité de transport, ou si elle a divergé des autres transporteurs ABC en n'ayant qu'une fonction régulatrice d'un canal ionique auquel elle doit être associée pour s'exprimer dans la membrane.

Les effecteurs peuvent être différenciés en deux grands groupes, les ligands endogènes et les composés synthétiques eux mêmes scindés en sous-groupes : les bloqueurs et les ouvreurs potassiques.

#### **4.10.1. Les ligands endogènes**

Le premier qui est également à l'origine du nom des canaux  $K_{ATP}$  est bien entendu l'ATP. Un millimolaire de cette molécule suffit à bloquer 95% des canaux en mode excisé inside-out.

Le site inhibiteur a été localisé sur la sous-unité Kir6.2 (cf. § Kir6.2/Régulation page 81) où l'ATP contrôle la probabilité d'ouverture de la porte, supposée être à proximité du site de fixation (Doyle et al., 1998).

Le récepteur des sulfonylurées est principalement le siège des sites d'activation du canal par les ligands endogènes tels que MgADP, MgATP en faible concentration, PIP<sub>2</sub>, des neurohormones, les protéines G, mais il est aussi inhibé par un peptide endogène, l'endosulfine. D'autres effecteurs restent peut-être à découvrir...

#### 4.10.1.1. MgADP

Le MgADP est l'activateur endogène principal des canaux K<sub>ATP</sub> (Nichols et al., 1996). Son site de fixation est majoritairement le 2<sup>ème</sup> domaine de liaison des nucléotides (NBD2). Son action activatrice n'est observable qu'à faible concentration, entre 10 et 100µM ; au delà elle est masquée par l'inhibition résultant de la fixation de l'ADP sur Kir6.2.

Le GTP et le GDP sont également capables d'activer les canaux K<sub>ATP</sub> dans une gamme de concentrations proche de celle du MgADP, ce qui n'est pas le cas de l'AMP, ni de l'AMPC, ni de l'adénosine (Dunne et Petersen, 1986a,b).

Le mécanisme d'activation par les nucléotides n'est pas encore résolu, d'autant plus qu'il est l'objet d'un paradoxe. En effet, lorsque les canaux sont fermés, la dépolarisation qui s'ensuit provoque la sécrétion d'insuline. Or, dans les conditions physiologiques (concentration d'ATP intracellulaire supérieure au millimolaire), les canaux devraient être constamment fermés et induire une sécrétion constante d'insuline comme dans le cas de la maladie PHHI. Ainsi dans des conditions de glycémie "normale", les canaux doivent être ouverts, d'où la proposition de plusieurs hypothèses, à commencer par celle dite de balance [ATP]/[ADP] (Deutsch et al., 1991 ; Seino, 1999). Dans ce cas, ce n'est pas la concentration propre de l'ATP qui régule le canal, mais la modification du ratio ATP/ADP. La concentration d'ATP peut être importante, mais si celle d'ADP est suffisante, les canaux sont ouverts. Cette hypothèse suppose une synergie logique entre l'augmentation de la concentration d'ATP et la réduction de la quantité d'ADP intracellulaire, augmentant la valeur du ratio ATP/ADP, et bloquant ainsi les canaux K<sub>ATP</sub>. La réciproque est également vraie, l'augmentation de la quantité d'ADP est liée à la diminution de la concentration d'ATP intracellulaire, diminuant le ratio ATP/ADP, ce qui induirait une activation des canaux K<sub>ATP</sub>. Cependant, ce modèle ne tient pas entièrement compte des valeurs de demi-

inhibition par l'ATP ( $K_i = 10\mu\text{M}$ ) et de la gamme de concentrations en ADP induisant une activation (entre 10 et 100  $\mu\text{M}$ ) mesurée par la technique de patch clamp en mode excisé inside-out. En effet, avec des concentrations de 3 à 6 mM d'ATP intracellulaire, la quantité d'ADP nécessaire pour contrebalancer l'effet inhibiteur de l'ATP doit être au moins supérieure au millimolaire. Or à ces concentrations, l'ADP devient également inhibiteur. Donc quelle que soit la variation du ratio, les canaux  $K_{\text{ATP}}$  sont toujours en conditions inhibitrices.

D'où une seconde hypothèse selon laquelle ce ne sont plus les concentrations d'ADP ou d'ATP qui régulent le canal, mais la configuration du récepteur des sulfonyles, soit **ATP-lié** qui ferme le canal, soit **ADP-lié** qui l'ouvre (Terzic et Vivaudou, 2001). Ainsi, quelle que soit la concentration intracellulaire en ATP ou en ADP, le canal reste activé tant que le MgADP est fixé sur son site, le NBD2, qui a plus d'affinité pour MgADP que pour MgATP. La libération du site de fixation du NBD2 (ou le remplacement de MgADP par MgATP) favoriserait alors la fermeture du canal induite par la fixation d'ATP sur Kir6.2. Trois causes sont possibles pour la présence de MgADP :

1) La première étant tout simplement la fixation de MgADP présent dans le milieu intracellulaire dont la concentration est parfois plus élevée que la normale en condition de stress comme l'ischémie.

2) La deuxième est basée sur un mécanisme de phosphotransfert interne entre les différents compartiments cellulaires (Djeza et Terzic, 1998). Le MgATP fixé sur le récepteur des sulfonyles fournirait son phosphate  $\gamma$  à cette cascade catalysée par l'adénylate cyclase (Elvir-Mairena et al., 1996), laissant sur le site du NBD2 le MgADP qui peut être ensuite phosphorylé suivant les conditions physiologiques de régulation. Ce modèle est très intéressant car les concentrations en produits adénylés n'interviennent plus dans le mécanisme de régulation du canal  $K_{\text{ATP}}$ , seul le phosphate est déplacé et sert de messager intracellulaire. Autre argument en faveur de ce modèle, le MgADP est présent sur son site activateur tant qu'il n'est pas rephosphorylé par la cascade de phosphotransfert. Le récepteur est donc en configuration ADP-lié qui active le canal. Ainsi en condition physiologique "normale", les canaux sont ouverts, et l'insuline n'est pas sécrétée. De plus, le catabolisme du glucose, sonde primaire de la glycémie pour les cellules  $\beta$  pancréatiques, se déroule en partie dans le cytoplasme *via* la glycolyse, mais surtout dans les mitochondries *via* le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire, qui sont les sources principales d'ATP.

La cascade de phosphotransfert serait le lien entre cette concentration élevée d'ATP dans les mitochondries suite à une glycémie importante, et la phosphorylation de MgADP sur SUR, ce qui provoquerait la fermeture des canaux  $K_{ATP}$  et par conséquent la sécrétion d'insuline pour rétablir l'homéostasie du glucose.

3) La troisième hypothèse pour la présence de MgADP sur le NBD2, est la possibilité très probable d'une activité ATPasique du récepteur des sulfonylurées, qui suivant les conditions de régulation physiologiques, hydrolyserait le MgATP fixé sur ses NBD, induisant des états ADP-lié activateurs. Cette activité ATPase a récemment été démontrée (Zingman et al., 2001), mais nous ne savons toujours pas quelle en est l'origine, car les substrats potentiels testés étaient des agents synthétiques, absents des milieux *in vivo*. Le substrat endogène du récepteur des sulfonylurées est toujours inconnu, même si nos suspicions se portent sur une activité flippase potentielle.

#### 4.10.1.2. MgATP

MgATP a un effet activateur à très faible concentration en se fixant sur le NBD1 du récepteur des sulfonylurées. De plus, l'application de MgATP empêche le "run-down" qui est une inactivation progressive et irréversible en absence de MgATP des canaux  $K_{ATP}$  lors des mesures en patch clamp. De nombreux auteurs postulent pour une phosphorylation nécessaire à l'activité du canal (Findlay et Dunne, 1986 ; Misler et al., 1986 ; Ohno-Shosaku et al., 1987), d'autant plus que des analogues non-hydrolysables de l'ATP sont incapables de se substituer au MgATP pour réactiver les canaux. Ce phénomène ressemble beaucoup à l'autophosphorylation des canaux ioniques (Levitan, 1985). A ce jour, le mécanisme de rundown n'est toujours pas élucidé, mais il reste cohérent avec l'hypothèse précédente selon laquelle les canaux  $K_{ATP}$  seraient régulés par une cascade de phosphotransfert, interrompue dans les expériences de patch clamp en mode excisé inside-out. Le MgADP présent dans le NBD2 s'échangerait lentement avec les solutions expérimentales qui en sont dépourvues, et l'ajout de MgATP ne jouerait pas un rôle dans une autophosphorylation quelconque, mais plutôt dans la "réalimentation" du NBD2 en MgATP qui serait hydrolysé en MgADP procurant au canal une configuration ADP-lié nécessaire à son activité. Ceci expliquerait que certaines expériences de patch clamp soient dépourvues de run down, la cause pouvant être due à l'utilisation de solutions d'ATP contaminées par de l'ADP lors de stockage trop prolongé.

#### 4.10.1.3. PIP<sub>2</sub> et PIP

Baukrowitz et al., 1998, et Shyng et Nichols, 1998, ont démontré que les phospholipides PIP<sub>2</sub> et PIP étaient des activateurs des canaux K<sub>ATP</sub>. Cependant, ces phosphoinositol-polyphosphates, pour être plus précis, sont différents des autres activateurs puisqu'ils sont enchâssés dans la membrane et peuvent être retenus à proximité des deux sous-unités du canal K<sub>ATP</sub> par un simple environnement (ou champ) électropositif sans site de fixation proprement dit, ce champ existant certainement soit au niveau des parties cytoplasmiques de SUR, soit au niveau des parties cytoplasmiques de Kir6.2 qui sont richement dotées en résidus basiques. Ainsi, une mutation ponctuelle de ces résidus dans Kir6.2 ne modifierait pas significativement l'effet du PIP<sub>2</sub>, tandis que de nombreuses mutations des résidus basiques situés à proximité du site de fixation de l'ATP ou de la porte, devraient diminuer drastiquement l'effet activateur du PIP<sub>2</sub>, mais cela risque également de diminuer la sensibilité à l'ATP car ce qui est vrai pour PIP<sub>2</sub> l'est également pour l'ATP<sup>4-</sup>. Le champ électropositif servirait à attirer l'ATP<sup>4-</sup> vers son site, entraînant dans ce champ des molécules, comme le PIP<sub>2</sub>, ou des domaines peptidiques chargés négativement comme la séquence polyE-D de SUR, potentiellement impliqués dans la fixation de l'ATP<sup>4-</sup> sur Kir6.2. Cela expliquerait également en partie que les dérivés de l'ATP moins chargés (ADP, AMP) soient des inhibiteurs moins efficaces avec un K<sub>i</sub> plus élevé.

Le PIP<sub>2</sub> serait également impliqué dans le "run-down" des canaux K<sub>ATP</sub>. Selon l'hypothèse actuelle (Loussouarn et al., 2001a), durant les expériences de patch clamp en mode excisé, la concentration de PIP<sub>2</sub> diminuerait au cours du temps à cause de PIP<sub>2</sub> phosphomonoestérase endogène (PIP<sub>2</sub>→PIP), diminuant par la même occasion l'activation des canaux K<sub>ATP</sub> qui s'inhiberaient lentement. L'ajout de MgATP aurait pour conséquence la phosphorylation du PIP en PIP<sub>2</sub> par la phosphatidylinositol 5-kinase (PI 5-kinase) (Shyng et al., 2000).

#### 4.10.1.4. Les neurohormones

Beaucoup de neurohormones régulent les canaux K<sub>ATP</sub>. Pour les citer, celles qui ont été mises en évidence pour activer les canaux K<sub>ATP</sub> pancréatiques sont : la galanine (de Weille et al., 1988 ; Dunne et al., 1989), la somatostatine (de Weille et al., 1989) et la vasopressine (Martin et al., 1989). L'adénosine et l'acétylcholine en sont aussi d'autres exemples (Terzic et al., 1994).

#### 4.10.1.5. Les protéines G

L'activité des canaux  $K_{ATP}$  est également régulée par des protéines fixant le GTP (protéines G), dont la sous-unité  $G\alpha-11$  stimulerait les canaux SUR1/Kir6.2 et SUR2A/Kir6.2, tandis que la sous-unité  $G\alpha-12$  n'activerait que SUR2A/Kir6.2 (Sanchez et al., 1998). Les sous-unités  $G\beta$  et  $G\gamma$  semblent n'avoir aucun effet sur l'activation des canaux  $K_{ATP}$  par les sous-unités  $G\alpha$ . Toutefois Wada et al., 2000, ont démontré que l'application en patch clamp des sous-unités  $G\beta \gamma_2$  induisait une baisse de l'inhibition par l'ATP des canaux SUR1/Kir6.2 et SUR2A/Kir6.2.

#### 4.10.1.6. L'endosulfine

L'endosulfine est un peptide endogène, démontré pour être un ligand des canaux  $K_{ATP}$  (Virsolvy-Vergine et al., 1992). L'application des protéines recombinantes de l' $\alpha$ -endosulfine, un peptide de 13 kDa, lors d'expériences de patch clamp, démontre qu'à  $10^{-6}$ - $10^{-8}$  M, (i) l'endosulfine inhibe la liaison des sulfonyles, (ii) ferme les canaux  $K_{ATP}$ , (iii) induit la sécrétion d'insuline. Il s'agit donc d'un régulateur des canaux  $K_{ATP}$  (Heron et al., 1998). Toutefois, bien que l'affinité semble trop faible pour justifier un rôle physiologique, il apparaît qu'en condition stimulante de glucose, l'affinité pour l'endosulfine est augmentée et se rapproche des conditions physiologiques (communication orale de M. Laurent Gros).

### 4.10.2. Les effecteurs synthétiques

L'activité des canaux  $K_{ATP}$  est régulable par de nombreux composés synthétiques soit inhibiteurs, soit activateurs. Étonnamment, les structures de ces molécules sont très hétéroclites malgré une forte spécificité tissulaire comme cela est précisé ci-dessous.

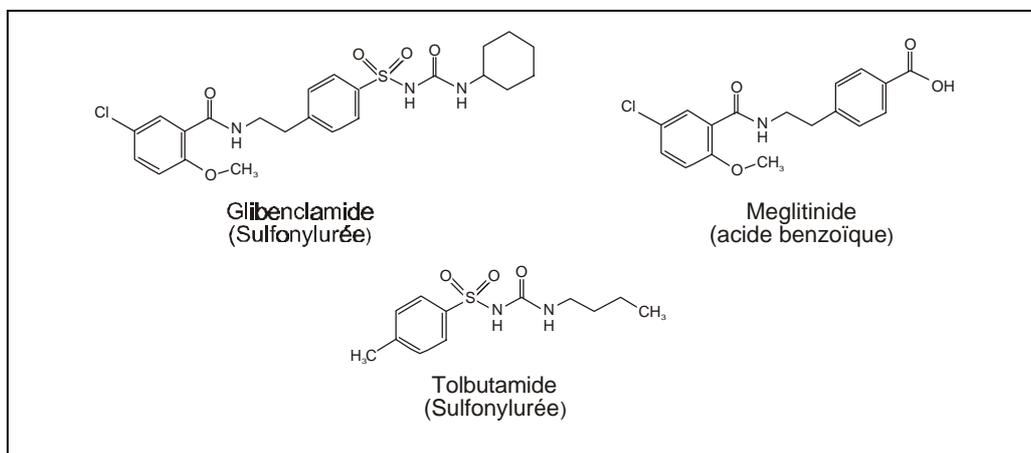
#### 4.10.2.1. Les sulfonyles et les bloqueurs

Les bloqueurs les plus connus sont bien entendu les sulfonyles (Ashcroft et Ashcroft, 1992) dont l'affinité est si forte qu'elles furent utilisées pour localiser le récepteur des sulfonyles (Kaubish et al., 1982). Ainsi le  $K_i$  de SUR1 pour la glibenclamide est d'environ 10nM chez le hamster et de 2nM chez le rat, tandis que l'affinité de SUR2A pour la glibenclamide est 500 fois plus faible. Les isoformes ont donc une affinité spécifique vis-à-vis des bloqueurs. Les sulfonyles sont largement utilisées pour augmenter la sécrétion d'insuline dans le cas des diabètes

non-insulino-dépendants (Aguilar-Bryan et al., 1995) et furent démontrés comme molécules hypoglycémiantes pour la première fois en 1942 par Jambon et Loubatière.

D'autres composés sans groupement sulfonyle ont également la capacité de bloquer les canaux  $K_{ATP}$ . Il s'agit par exemple du meglitinide qui correspond à la partie benzamido du glibenclamide. Ainsi, l'association du tolbutamide et du meglitinide forme le glibenclamide (Figure 24). Le 5-hydroxydecanoate (Notsu et al., 1992) et l'imidazoline phentolamine, un composé lipidique du lait (Proks et Ashcroft, 1997), sont également des bloqueurs des canaux  $K_{ATP}$ .

Historiquement, la première génération de sulfonyles avait, pour tête de liste, le tolbutamide (Figure 24). Cette molécule est capable de bloquer les canaux  $K_{ATP}$  lorsqu'elle est appliquée des deux côtés de la membrane. De plus comme pour le glibenclamide, SUR1 est plus sensible au tolbutamide ( $K_i = 7\mu\text{M}$ ) que SUR2A ( $400\mu\text{M}$ ). Une deuxième génération de sulfonyles fut créée en greffant un groupement benzamide ( $\text{Ar-CO-NH-R}$ ) sur la partie **sulfonyle** ( $\text{R}_1\text{-SO}_2\text{-NH-CO-NH-R}_2$ ), formant des molécules du type glibenclamide, 100 fois plus efficaces que le tolbutamide. A noter que l'effet des sulfonyles est d'autant plus important que leur caractère hydrophobe est élevé (Gylfe et al., 1984).



**Figure 24 :** Formules semi-développées de quelques bloqueurs des canaux  $K_{ATP}$  (M. Vivaudou)

### **Localisation du site d'action des bloqueurs**

Certaines sulfonyles comme le glibenclamide ont deux sites de fixation ayant des affinités distinctes : un site de forte affinité ( $K_i = 0.05\text{-}10\text{nM}$ ) sur le récepteur des sulfonyles (Aguilar-Bryan et al., 1995) et un site de faible affinité sur Kir6.2

(Gribble et al., 1997c). Les nucléotides diphosphates et dans une moindre mesure, les nucléotides triphosphates, régulent négativement la fixation des sulfonyles sur leur site de haute affinité (Alekseev et al., 1998). Les différences de sensibilité des deux isoformes SUR1 et SUR2A pour les bloqueurs tolbutamide, méglitinide et glibenclamide (tolbutamide+méglitinide), renforcent l'hypothèse selon laquelle les sites du tolbutamide et du méglitinide sont distincts mais proches dans l'espace car ils sont également sensibles au glibenclamide (Gribble et al., 1998b).

Le TMD2 de SUR a été identifié comme essentiel pour l'action du tolbutamide par une approche chimérique (Gribble et al., 1999), une partie du site de fixation se trouverait donc dans cette région.

#### 4.10.2.2. Les ouvreurs potassiques

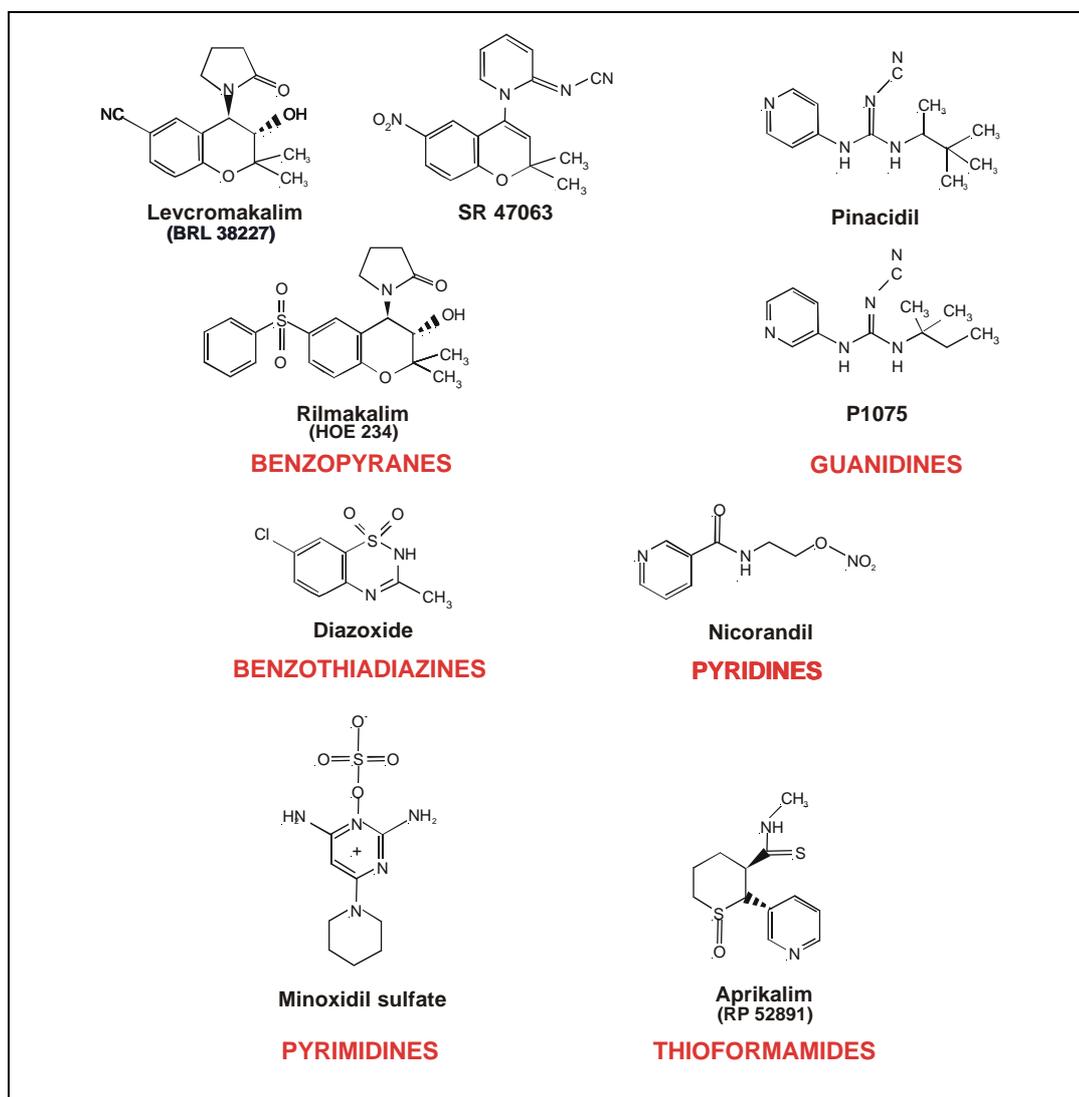
Le diazoxide fut le premier ouvreur des canaux  $K_{ATP}$  découvert pour son action sur les cellules  $\beta$  pancréatiques (Trube G et al., 1986) ; puis ce fut le cromakalim sur les cellules cardiaques (Escande et al., 1988) ; suivi du pinacidil sur ces mêmes cellules (Arena et al., 1989).

Depuis de très nombreux autres ouvreurs ont été découverts, mais étrangement, ceux-ci n'agissent que sur les canaux  $K_{ATP}$  composés des isoformes SUR2A ou SUR2B, et ont un pouvoir antihypertensif et vasorelaxant. Seul le diazoxide a la capacité d'activer spécifiquement les canaux  $K_{ATP}$  pancréatiques (et mitochondriaux dont la composition est encore inconnue), pourtant le diazoxide est structurellement corrélé aux sulfonyles et semble également produire des effets secondaires vasorelaxants et antihypertensifs.

Les ouvreurs potassiques sont classés en 6 groupes en fonction de leur structure (Terzic et Vivaudou, 2001), mais aucun pharmacophore n'a pu être identifié parmi toutes ces molécules (Figure 25). Les familles d'ouvreurs sont donc : les benzopyranes (cromakalim), les cyanoguanidines (pinacidil), les nitronicotinamides (nicorandil), les thioformamides (aprikalim), les pyrimidines (minoxidil), et les benzothiadiazines (diazoxide). Le levcromakalim, qui sera beaucoup utilisé dans les travaux présentés dans ce rapport, est un énantiomère transracémate du cromakalim : (-)-(3S,4R)-énantiomère. De même pour le P1075 qui est un dérivé du pinacidil et dont le radioisotope tritié est souvent utilisé pour les études de fixation.

De manière globale, l'activation des canaux  $K_{ATP}$  se traduit par une réduction de l'inhibition par l'ATP, que ce soit par le MgADP (Nichols et Lederer, 1991), les

ouvriers potassiques (Thuringer et Escande, 1989 ; Forestier et al., 1996), les phospholipides (Baukowitz et al., 1998 ; Shyng et Nichols, 1998) ou encore les protons (Vivaudou et Forestier, 1995).



**Figure 25** : Structures semi-développées et familles de différents ouvriers des canaux  $K_{ATP}$  (M. Vivaudou)

### Mécanisme d'action des ouvriers (sujet de cette thèse)

De même que pour les bloqueurs, le mécanisme d'action des ouvriers reste un mystère. Le but de cette thèse est d'éclaircir deux points de ce mécanisme : 1) le rôle des nucléotides dans le mécanisme d'action des ouvriers, et 2) localiser les déterminants moléculaires du site de fixation des ouvriers avec pour objectif à long terme de découvrir les rouages moléculaires activés par ces molécules à forts potentiels thérapeutiques. Malheureusement leurs effets secondaires limitent leur utilisation et nous espérons que la découverte du site de fixation, puis sa

cartographie permettra de réaliser des molécules par "Drug Design", spécifique d'une isoforme.

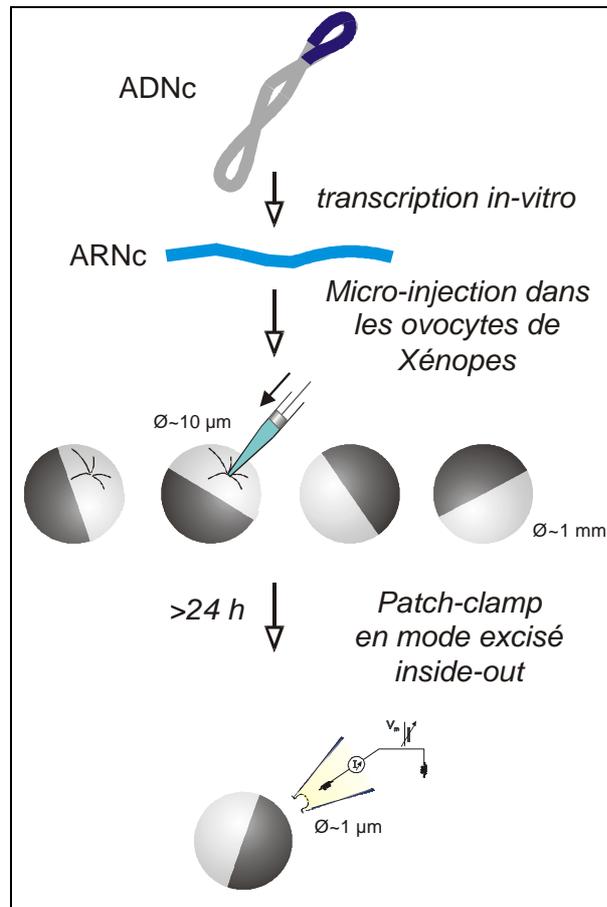
Deux approches ont été choisies dans cette étude. (i) Les recherches sur l'implication des NBD dans le mécanisme d'activation des canaux  $K_{ATP}$  par les ouvreurs s'effectuent sur des mutants ponctuels dans ces domaines de liaison des nucléotides, créés selon des résultats publiés précédemment et caractérisés par la technique du patch clamp en présence de différents ouvreurs. (ii) La deuxième approche utilisée pour localiser le site de fixation des ouvreurs, emploie une stratégie chimérique entre les isoformes SUR1 et SUR2A, rendue possible par la forte homologie entre ces deux protéines, et par leur spécificité pharmacologique. La localisation est ensuite affinée par des échanges de résidus entre les deux isoformes, à l'aide de mutations ponctuelles réalisées par PCR.

L'aspect technique de ces expériences est détaillé ci-dessous.

## **MATERIEL ET METHODES**

## 5. Matériel et Méthodes

Les méthodes utilisées peuvent être résumées selon le schéma suivant:



**Figure 26:** Mode opératoire simplifié d'étude des canaux  $K_{ATP}$  sauvages, chimériques et mutants

Le principe est basé sur la construction de récepteurs des sulfonylurées sauvages, chimériques ou mutants par des techniques de biologie moléculaire utilisant principalement la PCR. Le gène est ensuite transcrit *in vitro* en ARNc avant d'être micro-injecté avec l'ARNc de Kir6.2 dans des ovocytes de *Xénopes*. Après 24 heures minimum d'incubation à 19°C, les ovocytes sont débarrassés manuellement de leur membrane vitelline. Les canaux  $K_{ATP}$  exprimés dans la membrane plasmique sont alors prélevés à l'aide d'une pipette de patch clamp. Différentes solutions sont appliquées sur la face cytoplasmique du canal, et nous mesurons leurs effets sur l'activité des canaux  $K_{ATP}$  en enregistrant les courants qu'ils génèrent. Les concentrations ioniques sont invariantes dans les solutions utilisées, et le potentiel de membrane est imposé à  $-50$  mV.

Ce chapitre présentera d'une manière globale l'ensemble des principes du matériel et des méthodes utilisés, dans le but d'alléger sa lecture. Les précisions sont apportées dans les publications et les protocoles annexés à la fin de ce mémoire.

## 5.1. Biologie moléculaire

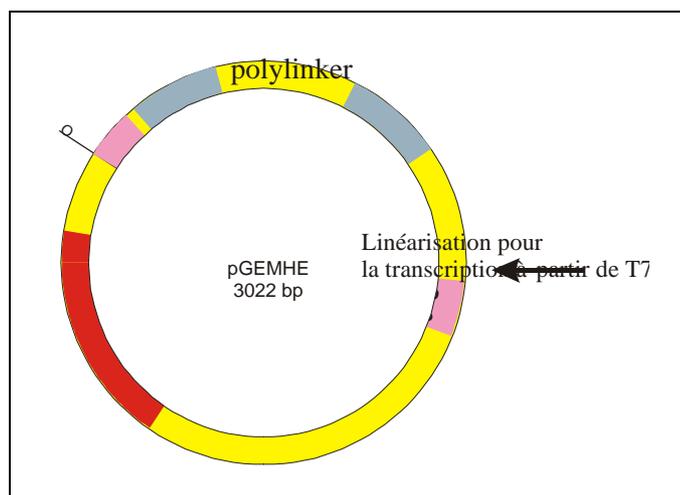
### 5.1.1. Matériel biologiques

#### 5.1.1.1. Clones disponibles

- SUR1 de hamster, référence: DDBJ/EMBL/n° d'accession dans GenBank : L40623. Aimablement fourni par le Dr J. Bryan (Baylor college of medecine, Houston, USA)
- SUR2A de rat, référence: DDBJ/EMBL/n° d'accession dans GenBank : D83598.
- Ki6.2 de souris, référence: DDBJ/EMBL/n° d'accession dans GenBank : D50581.

Ces deux clones ont également été aimablement fournis par le Dr Susumo Seino (Chiba University School of medecine, Japan)

Les ADNc de kir6.2, de SUR1 et de SUR2A ont été sous-clonés, pour les deux premiers, dans le vecteur pGEMHE (Dr D Logothetis-Mount Sinai Hospital, New York) (Figure 27), et pour le dernier dans le pGEMHE2 (créé au laboratoire par le Dr F. Pagès). Ces plasmides ont des cartes de restrictions différentes et sont dérivés du vecteur d'expression commercial pGEM3Z Promega adapté à l'expression protéique dans les ovocytes de *Xénopus*.



**Figure 27.** Vecteur d'expression ovocytaire pGEMHE

Le promoteur T7 sert à la transcription *in vitro*  
Les parties 3' et 5'ut sont les parties non traduites du gène de la globine  $\beta$ 1 de *Xénopus*, induisant un niveau élevé d'expression protéique.

### 5.1.1.2. Bactérie compétente

Les ADNc sont amplifiés dans un système bactérien classique utilisant une souche d'*Escherichia coli* rendue compétente. Cette souche doit être sensible à l'ampicilline pour pouvoir sélectionner les clones transformés par le plasmide.

Ces bactéries sont rendues compétentes par le  $\text{CaCl}_2$  à froid, puis transformées par choc thermique à  $42^\circ\text{C}$ .

### 5.1.1.3. Xénopus laevis

Ces amphibiens de la famille des crapauds ont été achetés au centre de recherches en biochimie macromoléculaire (CNRS) de Montpellier.

Les avantages des ovocytes de *Xénope* résident dans leur taille ( $> 1 \text{ mm}$ ), la quantité disponible et leur machinerie cellulaire eucaryote.

Le prélèvement des ovocytes s'opère sous anesthésie (avec un anesthésiant percutané : 3-aminobenzoï c acid éthyl ester) et sur la glace. A chaque opération hebdomadaire, deux *Xénopes* sont opérées afin de diversifier les lots, diminuant ainsi le risque d'en obtenir un mauvais.

Lors du prélèvement, les ovocytes sont disposés en grappe, elle-même répartie dans des lobes différents. Les ovocytes sont ensuite individualisés par un traitement enzymatique à la collagénase, et sélectionnés selon plusieurs critères: leur taille, l'homogénéité de leur forme et de leur pigmentation polarisée (Figure 28) et la présence d'un anneau clair à l'interface des deux pôles. Tous ces phénotypes caractérisent une maturité nécessaire à la traduction *in vivo* des ARNc.

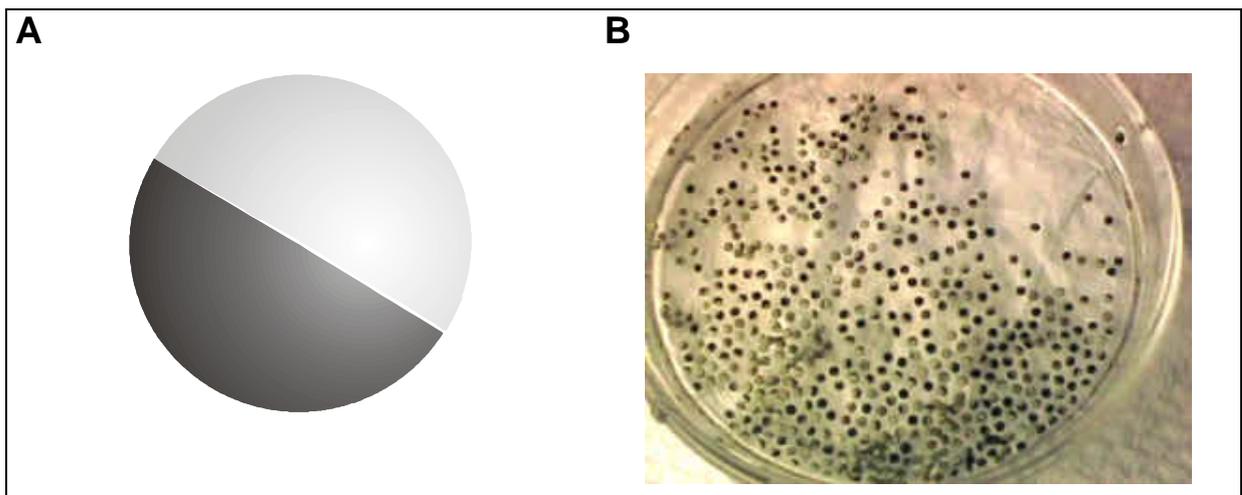


Figure 28 : **Aspect des ovocytes de *Xénope***

**A)** Vue équatoriale d'un ovocyte schématisé de *Xénope*. **B)** Boîte de Pétri contenant des ovocytes de *Xénope* matures et individualisés.

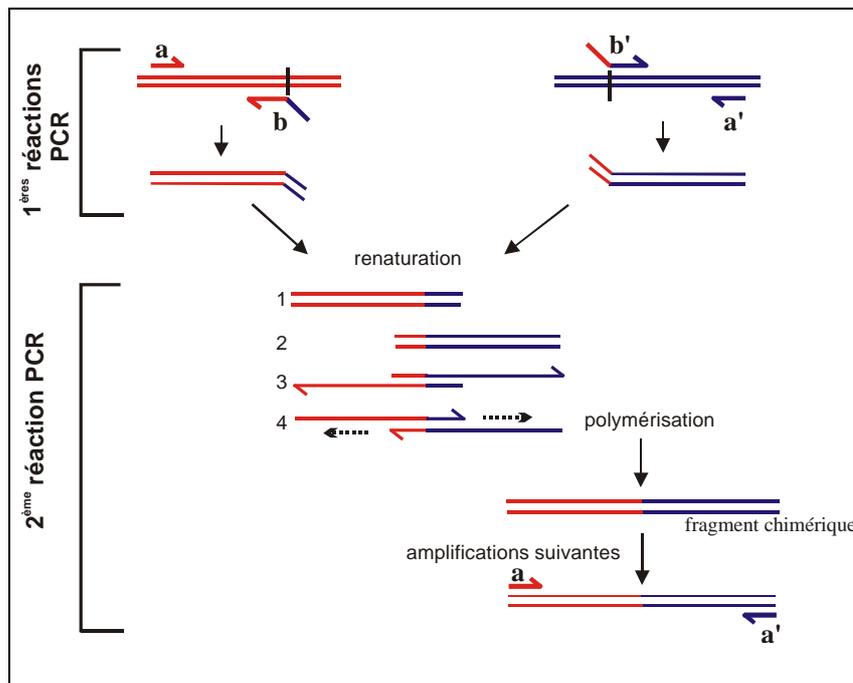
La conservation des ovocytes s'effectue dans une solution physiologique contenant des antibiotiques (pénicilline, streptomycine) et un antifongique (gentamicine). La durée moyenne de conservation après micro-injection est d'une semaine, avec un maximum observé de deux semaines.

## **5.1.2. Méthodes de biologie moléculaire**

### 5.1.2.1. Construction des protéines chimériques

Les protéines chimériques ont été construites en utilisant la technique dite de "Splicing by Overlap Extension" ou SOE. Cette technique a été mise au point dans les années 90 (Horton et al., 1989 ; Warrens et al., 1997). Elle est basée sur la recombinaison de deux molécules d'ADN à des jonctions précises en utilisant la technique de PCR. L'avantage indéniable de cette technique est l'absence d'insertion de nouveaux sites de restriction dans les vecteurs. Son inconvénient est lié au risque de créer des mutations aléatoires par PCR, d'où la nécessité de séquencer l'ADNc des clones obtenus après transformation bactérienne.

Le principe de la réaction SOE est illustré sur la Figure 29. Deux oligonucléotides hybrides (*b* et son complémentaire *b'*, Figure 29) sont conçus pour chevaucher la jonction (symbolisée par le trait vertical noir) des fragments bleu et rouge. Les deux premières réactions PCR ont lieu en parallèle pour générer deux molécules filles hybrides dont la taille est vérifiée sur gel avant d'être purifiées par le kit QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN). Ces premières molécules hybrides sont ensuite mélangées puis ré-introduites dans une nouvelle réaction de PCR générant 4 hybridations possibles. Une seule cependant (n°4, Figure 29) libère des extrémités 3'-OH accessibles à la polymérase Vent (Biolabs). Remplissant son rôle lors des cycles de PCR, elle fournit le fragment chimérique qui sera amplifié dans les cycles suivants grâce aux amorces *a* et *a'*.



**Figure 29.** Description des différentes étapes lors d'une réaction SOE

Les autres combinaisons (1, 2, 3 Figure 29) ne sont pas amplifiées car non accessibles à l'ADN-polymérase, aucun des brins n'offrant de matrice à copier. Cependant elles peuvent entrer en compétition avec l'hybridation 4. Une PCR asymétrique, permettant d'amplifier les brins présents dans cette dernière hybridation, ainsi qu'une dénaturation à 100°C, précédant la deuxième PCR, sont parfois préconisées pour réduire les hybridations parasites.

La méthode SOE a été utilisée pour construire les parties jonctionnelles de nombreuses chimères entre SUR1 et SUR2A. En effet, elle fut une alternative efficace pour pallier aux manques de sites de restriction communs entre les deux isoformes. Dans les deux premières réactions de PCR, les vecteurs entiers, pGEMHE-SUR1 et pGEMHE2-SUR2A, ont servi de matrice, puis les fragments d'ADN hybrides obtenus à la fin de la réaction SOE ont été clonés classiquement par digestion-ligation dans le vecteur adéquate contenant SUR1 ou SUR2A, créant ainsi les protéines chimériques souhaitées.

L'assemblage des fragments plasmidiques avec les fragments chimériques produits par SOE s'effectue par digestion-ligation en utilisant des sites de restriction préexistants et uniques. La digestion enzymatique peut s'effectuer avec une même enzyme, ou avec des enzymes différentes. Dans le cas d'une même enzyme (ou d'enzymes générant des extrémités compatibles) il est nécessaire de déphosphoryler

préalablement le vecteur de clonage pour éviter toute recircularisation lors des réactions de ligation.

Une fois les fragments hybrides ligués dans le vecteur (Rapid Ligation Kit, Boehringer), les colonies obtenues après transformation sont criblées par PCR dite analytique (même oligonucléotide que SOE). L'ADN des colonies positives est alors purifié par la technique de "midiprep" (Plasmid Midi Kit, QIAGEN) présentée dans les paragraphes suivants. La bonne orientation de l'insertion est déterminée par le profil de digestion du vecteur, avant de vérifier la construction par séquençage.

#### 5.1.2.2. Mutagenèse dirigée par PCR

La méthode de mutagenèse dirigée permet de créer des mutations ponctuelles qui correspondront dans notre étude à des transitions d'un résidu en un autre.

Cette méthode utilise les performances de haute fidélité de la polymérase PfuTurbo DNA. La méthode du kit QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis (Stratagene®, Figure 30) consiste à amplifier, par PCR, une mutation située sur des oligonucléotides de synthèse. Ces amorces, d'une trentaine de nucléotides, dont 4 ou 5 seulement sont mutés, s'hybrident avec la matrice "sauvage". Le premier cycle de la PCR génère une nouvelle matrice mutée qui sera amplifiée lors des cycles suivants avec les mêmes amorces mutées. Les produits de la PCR sont donc majoritairement formés d'ADNc mutés. Les vecteurs "parentaux", originellement méthylés, sont digérés par l'enzyme de restriction DpnI. Le résultat est préalablement vérifié sur gel d'agarose avant de débiter la transformation des bactéries compétentes.

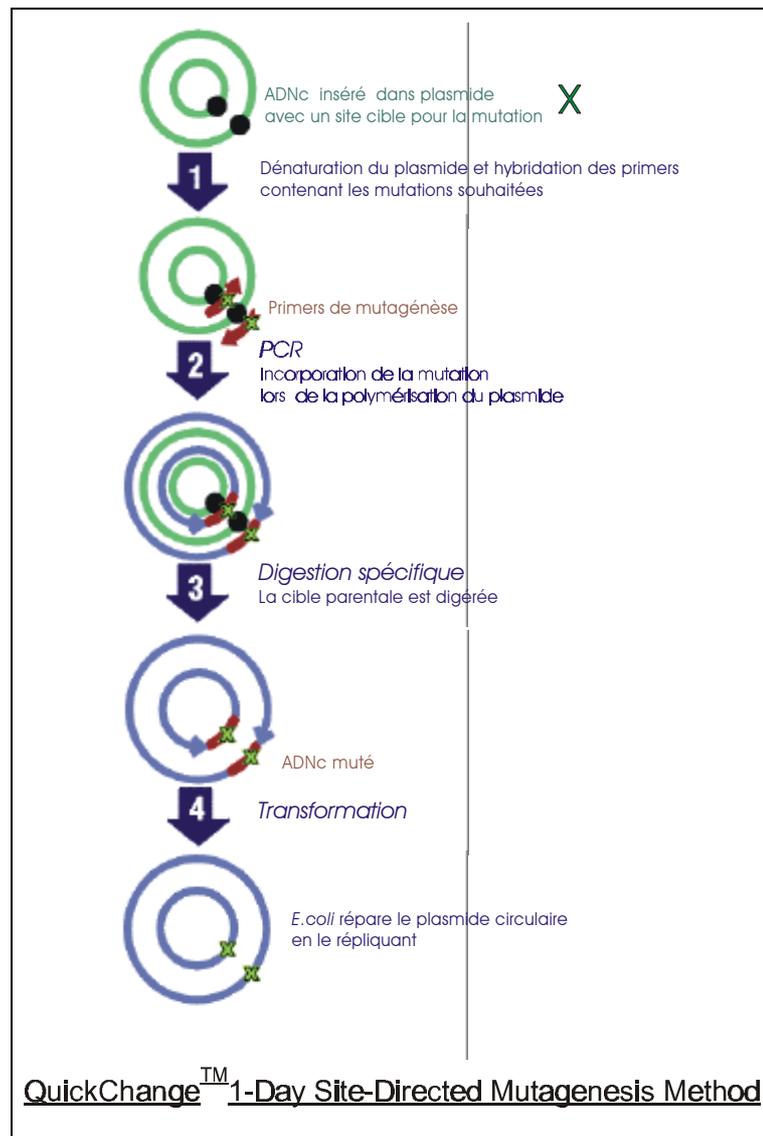


Figure 30 : Description des étapes de mutagenèse dirigée

### 5.1.2.3. Transformation des bactéries compétentes

Les bactéries *E. Coli* préalablement rendues compétentes en présence de  $\text{CaCl}_2$  à froid, sont incubées quelques secondes à  $42^\circ\text{C}$  avec les produits de PCR. Ce choc thermique facilite l'introduction de l'ADN dans les cellules bactériennes, et les clones positifs sont sélectionnés sur un milieu riche contenant de l'ampicilline (le plasmide est pourvu du gène de résistance,  $\text{Amp}^R$ ).

Plusieurs colonies sont ensuite prélevées, incubées sur boîte de Pétri et ensemencées en milieu liquide pour une purification de l'ADN par Miniprep. Le but est de vérifier, par digestion enzymatique, la présence de la mutation.

#### 5.1.2.4. Miniprep d'ADN

A partir d'une culture bactérienne de seulement 5 ml de milieu riche avec ampicilline, ce protocole rapide permet d'extraire l'ADN plasmidique par lyse alcaline. Le principe repose sur une dénaturation différentielle entre l'ADN génomique, de structure relâchée, et l'ADN plasmidique super-enroulé. Lorsque de la soude est ajoutée au lysat cellulaire, seul l'ADN génomique est dénaturé de façon irréversible. L'addition d'acide et de sel forme un réseau insoluble d'ADN génomique, tandis que l'ADN plasmidique se resolubilise dans sa structure native. La centrifugation permet l'élimination d'une grande partie des macromolécules inutiles telles que les protéines, l'ARN et l'ADN génomique dénaturé (accroché à la membrane). Le surnageant ne contient plus que l'ADN plasmidique qui est récupéré par précipitation à l'éthanol.

L'ADN plasmidique ainsi purifié sert principalement aux étapes de contrôle. Une fois les clones vérifiés par digestion enzymatique, ceux-ci sont ré-ensemencés dans des volumes beaucoup plus importants (MidiPrep), dans le but d'obtenir une grande quantité d'ADN qui servira de matrice pour la transcription *in vitro* par exemple.

#### 5.1.2.5. MidiPrep d'ADN

Le principe reste le même que celui décrit ci-dessus, mais avec des volumes de culture bactérienne 10 fois plus importants. Non seulement la quantité d'ADN obtenue est plus grande, mais la pureté est également meilleure puisque la préparation est pré-filtrée et purifiée sur colonne d'affinité. Le pré-filtrage permet de retenir les plus gros débris membranaires et agrégats tandis que la résine échangeuse d'ions lie fortement l'ADN plasmidique, l'élution étant réalisée par modification de la force ionique. L'ADN est ensuite dessalé et précipité. Le kit utilisé est le Plasmid Purification (QIAGEN®).

#### 5.1.2.6. Séquençage

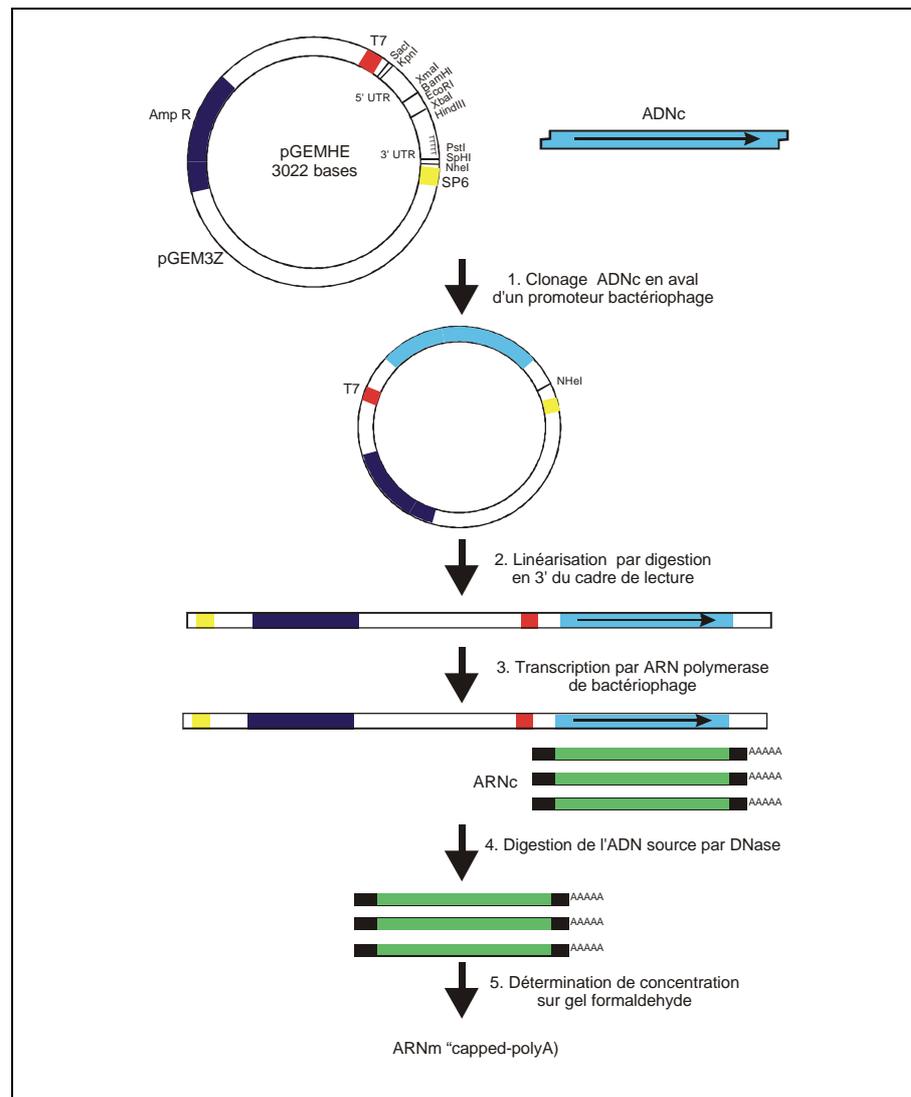
La technique de séquençage utilisée est adaptée de celle décrite par Sanger et *al.* (1977). La réaction de séquençage est effectuée par l'entreprise Genome Express de Grenoble sur séquenceur automatique. Quatre réactions de PCR sont menées parallèlement en présence d'une des quatre bases marquées par un fluorochrome spécifique sous forme de di-désoxyribonucléoside triphosphate en très faible concentration et d'un seul primer qui détermine le sens du séquençage.

#### 5.1.2.7. Transcription

Toutes les solutions et matériels utilisés sont "nuclease-free" ou "RNase free", l'eau étant traitée au diéthyl-pyrocarbonate (DEPC).

La transcription *in vitro* est possible dans le cas de nos constructions car les plasmides pGEMHE et pGEMHE1 contiennent le promoteur du phage T7 situé en amont des gènes codant pour les sous-unités des canaux  $K_{ATP}$ . Le kit de transcription *in vitro* ("mMESSAGE mMACHINE, Ambion") utilise l'ARN Polymérase T7 pour la transcription de l'insert jusqu'au site de linéarisation situé en aval de la séquence codant pour la queue poly-A (Figure 31). Auparavant, les ADNc des midiprep sont linéarisés, puis purifiés par extraction au phénol/chloroforme/isoamyl-alcool et précipitation à l'éthanol. Un aliquote est déposé sur gel d'agarose pour contrôler la qualité de la digestion. Le clone linéarisé et vérifié sert alors de matrice pour la polymérase T7.

Après la transcription, les ARNc sont purifiés par extraction au phénol/eau et précipitation à l'isopropanol. Une migration électrophorétique sur gel d'agarose dénaturant (en présence de formaldéhyde) permet de vérifier la taille, l'intégrité et d'estimer la quantité des ARN en comparant le résultat avec un marqueur de concentration.



**Figure 31** : Description des étapes de la transcription *in vitro*

Les ARNc de SUR1, SUR2A, des protéines chimériques ou des mutants ainsi obtenu, sont co-micro-injectés avec l'ARNc de Kir6.2 dans les ovocytes de *Xénope*, à raison de 50 nl par ovocyte. Les ARNc stocks sont aliquotés et conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## 5.2. Expression hétérologue du canal KATP

La technique employée pour exprimer les canaux  $K_{\text{ATP}}$  recombinants est la micro-injection d'ARNc dans les ovocytes de *Xénope*.

Cette technique est quelque peu brutale, puisque nous perforons, à l'aide d'une pipette, leur membrane vitelline et plasmique jusqu'au cytoplasme dans lequel nous injectons jusqu'à 50 nl du mélange d'ARNc de Kir6.2 et de SUR. L'appareil utilisé est un nano-injecteur (NanoJect, Drummond) précalibré.

Les ovocytes de *Xénope* traduisent alors l'ARNc grâce à l'accumulation d'un stock important d'enzymes, d'organelles subcellulaires, de ribosomes et d'ARNt

durant l'ovogénèse. De plus, le système d'expression ovocytaire effectue les modifications post-traductionnelles propres aux eucaryotes, telles que la glycosylation, la phosphorylation, le clivage des précurseurs... Dans la majorité des cas, les canaux exprimés dans ce système sont correctement adressés vers la membrane plasmique ce qui le classe parmi les systèmes d'expression hétérologue les plus pratiques pour des études électrophysiologiques.

Dans notre cas d'étude, ce système présente également l'avantage de disposer d'une faible densité de canaux potassiques endogènes et, mise à part dans les cellules folliculaires, de l'absence totale de canaux potassiques sensibles à l'ATP dans la membrane plasmique.

Nous pouvons ensuite étudier l'influence des différentes modifications apportées par la biologie moléculaire sur l'activité du canal, et essayer d'en déduire les mécanismes moléculaires de la régulation pharmacologique du canal.

### **5.3. Caractérisation fonctionnelle**

Une fois exprimés dans la membrane des ovocytes de *Xénope*, les canaux  $K_{ATP}$  recombinants sont caractérisables par la technique du patch clamp.

Cette technique permet de mesurer et d'enregistrer en temps réel la variation du courant ou du potentiel induits par les flux ioniques transitant à travers les canaux ioniques. Elle a été mise au point par Neher et Sakmann en 1976, ce qui leur a valu le prix Nobel de Médecine et Physiologie en 1992.

Le principe repose, dans nos expériences, sur le prélèvement d'un fragment de membrane lipidique à l'aide d'une micropipette de verre. Les canaux ioniques qui y sont emprisonnés sont alors isolés physiquement de la cellule, et les courants traversant ces canaux sont mesurés. Cette technique a permis de grandes avancées dans les études des phénomènes électrophysiologiques.

#### **5.3.1. Principe de la technique du Patch-Clamp**

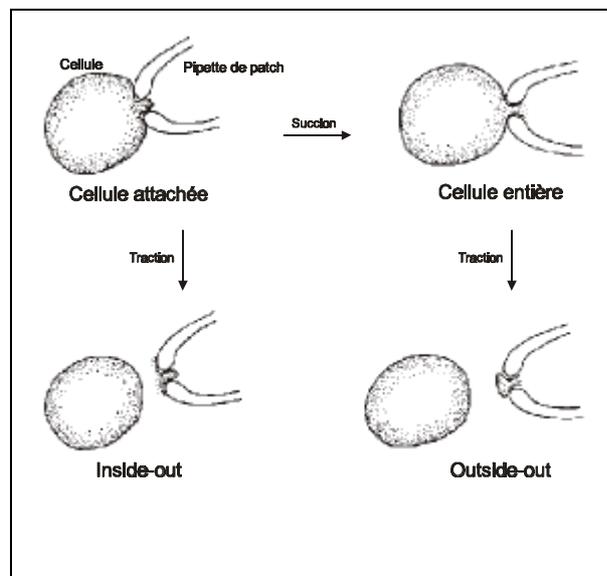
Une micropipette en quartz ou en verre est étirée par chauffage, l'extrémité atteint un diamètre d'environ 1  $\mu\text{m}$ . Remplie d'une solution saline conductrice ou d'électrolytique, cette pipette est posée sur la membrane plasmique d'une cellule telle que l'ovocyte de *Xénope*, puis une légère succion crée un contact très étroit (seal) entre la membrane et le verre. La résistance de ce contact ne cesse d'être augmentée jusqu'à dépasser le Giga-ohm. Cette parfaite isolation électrique et

mécanique entre le fragment de membrane et le verre, est la clé de cette technique sans laquelle elle ne pourrait exister. Ce "Giga-Seal" augmente le rapport signal sur bruit à un tel point qu'il est possible de mesurer les courants traversant un seul canal (de l'ordre du pA) (Hamill et al., 1981). Cette observation se vérifie par la loi d'Ohm ( $U = RI$ ; U : tension, R : Résistance, I : Intensité), une résistance avoisinant le Giga-Ohm permettant de mesurer des courants de l'ordre du pA ( $I = 10^{-3} \text{ V} / 10^9 \Omega$ ).

Selon les conditions expérimentales désirées, (en conditions cellulaires globales ou restreintes, en conditions isolées avec accessibilité aux faces intra- ou extracellulaires), l'enregistrement des courants peut être réalisé selon différentes configurations.

### 5.3.2. Les configurations du patch clamp

La configuration la plus simple est dite cellule-attachée (cell-attached) (Figure 32). Elle consiste à créer un Giga-seal après le contact avec la membrane cellulaire. Cette configuration permet de mesurer l'activité des canaux présents sous la pipette, dans des conditions d'intégrité cellulaire. Elle présente l'avantage de pouvoir étudier des voies de signalisation intracellulaire complète, mais son inconvénient majeur est la difficulté de modifier le milieu intracellulaire. A noter que dans ce cas, le potentiel imposé à la membrane correspond à la différence entre le potentiel de membrane de la cellule et celui de la pipette.



**Figure 32** : Les différentes configurations de la technique du patch-clamp

A partir de la configuration cellule-attachée, une suction ou une légère dépression supplémentaire conduit à la rupture de la portion de membrane piégée

sous la pipette. Cette configuration dite cellule-entière (whole-cell) permet d'enregistrer les courants traversant l'ensemble des canaux de la membrane cellulaire. L'avantage de cette technique est la mesure de macro-courants en conditions physiologiques. L'inconvénient reste la difficulté de modifier rapidement les conditions intracellulaires, mais également la dilution du cytoplasme au moment de la rupture de la membrane. Dans cette configuration, le potentiel imposé est égal à celui de la pipette.

Si au lieu de briser le fragment de membrane nous l'excisons, nous obtenons alors la configuration dite excisée en mode inside-out. Cette technique possède l'indéniable avantage de pouvoir accéder aisément aux sites de régulation intracellulaire des canaux. C'est la raison pour laquelle nous l'employons dans l'étude des mécanismes de régulation des canaux  $K_{ATP}$  par les nucléotides et les ouvreurs. De plus comme cela est décrit dans le paragraphe "instrumentation", notre appareillage permet de modifier très rapidement les solutions appliquées sur la face cytoplasmique. Les inconvénients majeurs de cette technique sont l'absence des composants cytoplasmiques (protéines cytosoliques, cytosquelette, ...) pouvant réguler l'activité de certains canaux, et le lavage permanent que subissent ces canaux. Autre point, l'excision favorise le phénomène de "run-down" qui correspond à une inactivation progressive et parfois irréversible des canaux. Dans cette configuration, le potentiel imposé est inversé par rapport à celui de la pipette.

Une autre configuration "excisée" possible est celle dite excisée outside-out obtenue en éloignant la pipette de la cellule en configuration cellule entière. La face extracellulaire est alors aisément accessible et le milieu intracellulaire est remplacé par celui de la pipette. L'avantage de cette technique par rapport aux configurations non-excisées, est la possibilité de modifier rapidement les solutions appliquées sur la face extracellulaire, l'inconvénient étant comme toute configuration excisée, la perte des composants cytoplasmiques. Le potentiel imposé est celui de la pipette.

### **5.3.3. Instrumentation et poste opératoire (Figure 33)**

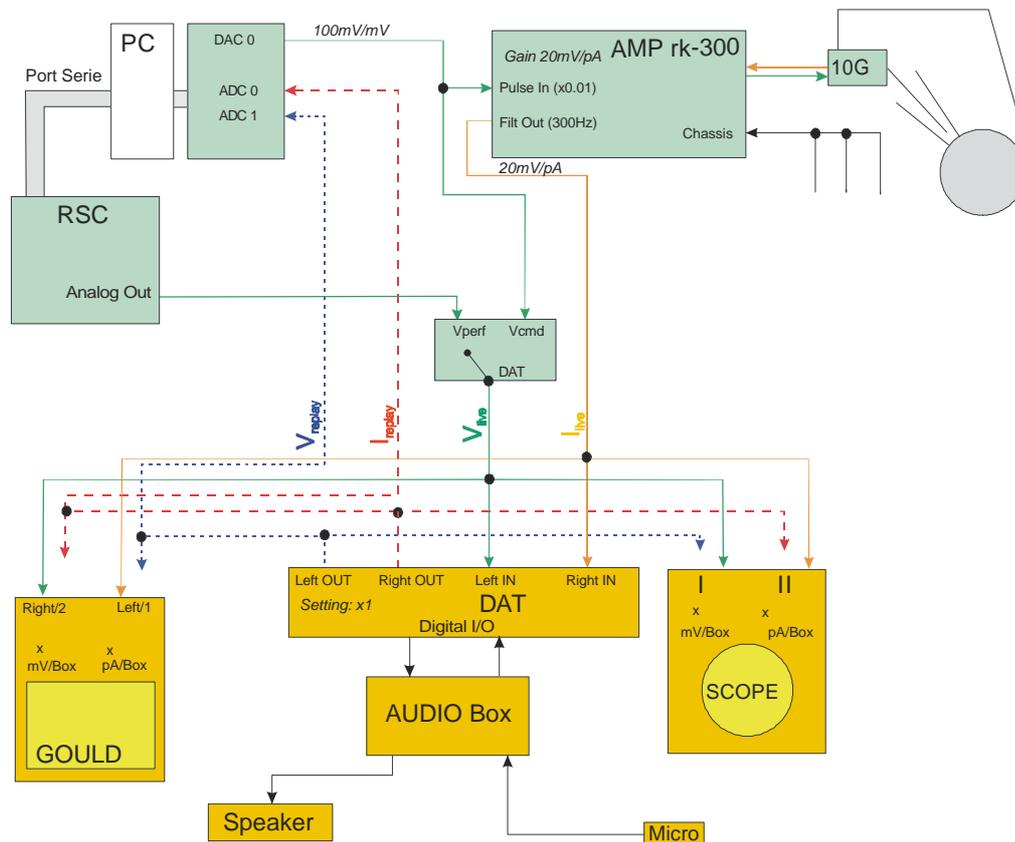
L'expérience est réalisée sous microscope de type inversé (oculaire Olympus 4x, 10x, 40x) placé à l'intérieur d'une cage de Faraday. Le bon déroulement de l'expérience est suivi sur un moniteur relié à une caméra CCD (Caméra Panasonic WV1600F). La pipette d'enregistrement est étirée à partir d'un tube capillaire de borosilicate (KIMAX-51, size 0.8-1.10\*100mm), et insérée sur l'électrode du

micromanipulateur (BioLogic). Les courants ioniques sont amplifiés par un RK300 (BioLogic). Cet amplificateur permet de convertir le courant enregistré en tension selon le gain de conversion choisi et d'imposer le potentiel de membrane par l'intermédiaire de l'électrode de la pipette. Les courants sont filtrés entre 0.3 et 1kHz. Tous les signaux (courants, changement de perfusion..) sont numérisés sur cassette digitale audio par l'enregistreur de données analogiques DTR1200 (BioLogic). Les traces écrites des enregistrements sont conservées sur papier grâce à l'enregistreur papier RS 3200 (Gould). Tous les signaux sont visualisés en direct sur l'oscilloscope HM305 (Hameg). L'ensemble de la partie expérimentale liée à la stimulation électrique du patch, au contrôle du potentiel, au changement de solutions *via* la tête de perfusion (RSC100, BioLogic), à l'acquisition des données, est piloté par ordinateur grâce aux logiciels Perf et Erwin conçus par Michel Vivaudou.

A



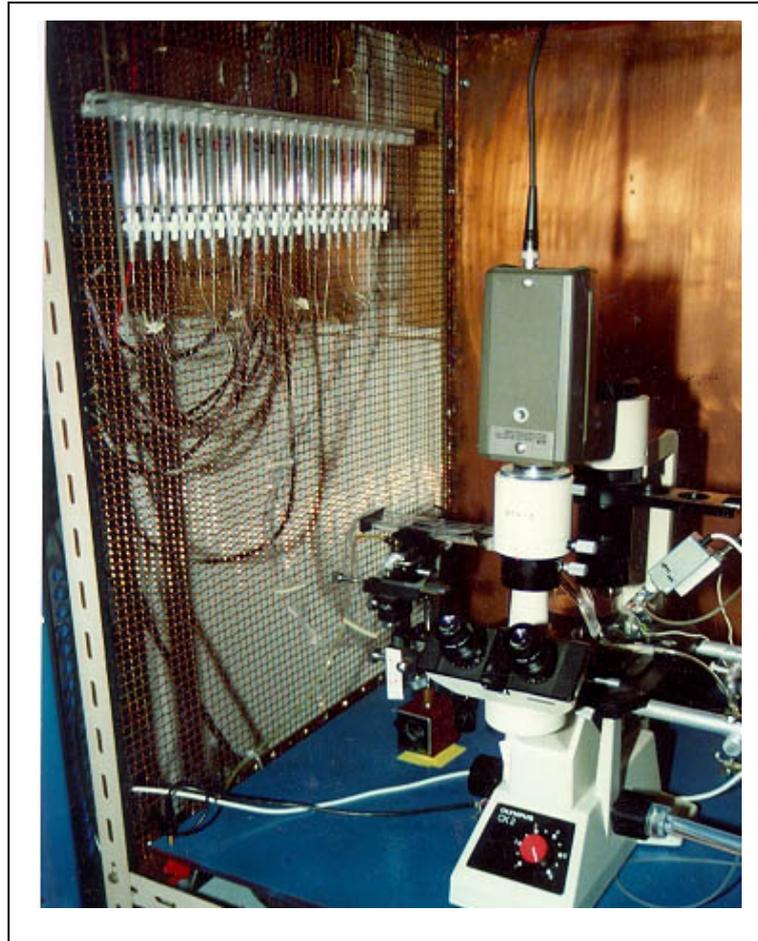
B



**Figure 33** : Le poste de patch clamp (M. Vivaudou)

**A)** Photo du poste de patch. A gauche, le rack contenant l'enregistreur analogique et papier, l'amplificateur de courant et le contrôleur de la tête de perfusion. Au centre la cage de Faraday renfermant le microscope, le micromanipulateur et le système de perfusion. A droite l'ordinateur pilote les expériences et permet l'analyse des résultats. **B)** Schéma des connexions électriques entre les différents appareils.

Le système de perfusion présenté en Figure 34 comprend dans sa partie supérieure (en haut à gauche sur la photographie), une série de réservoirs contenant chacun une solution expérimentale. Ils sont reliés par des capillaires à la tête de perfusion comprenant autant de sorties que de réservoirs. Cette tête est située au niveau de la plate-forme du microscope, et le diamètre des sorties est suffisamment gros pour produire un flux important et constant de solution sur la pipette de patch. L'écoulement des solutions s'effectue par simple gravité.



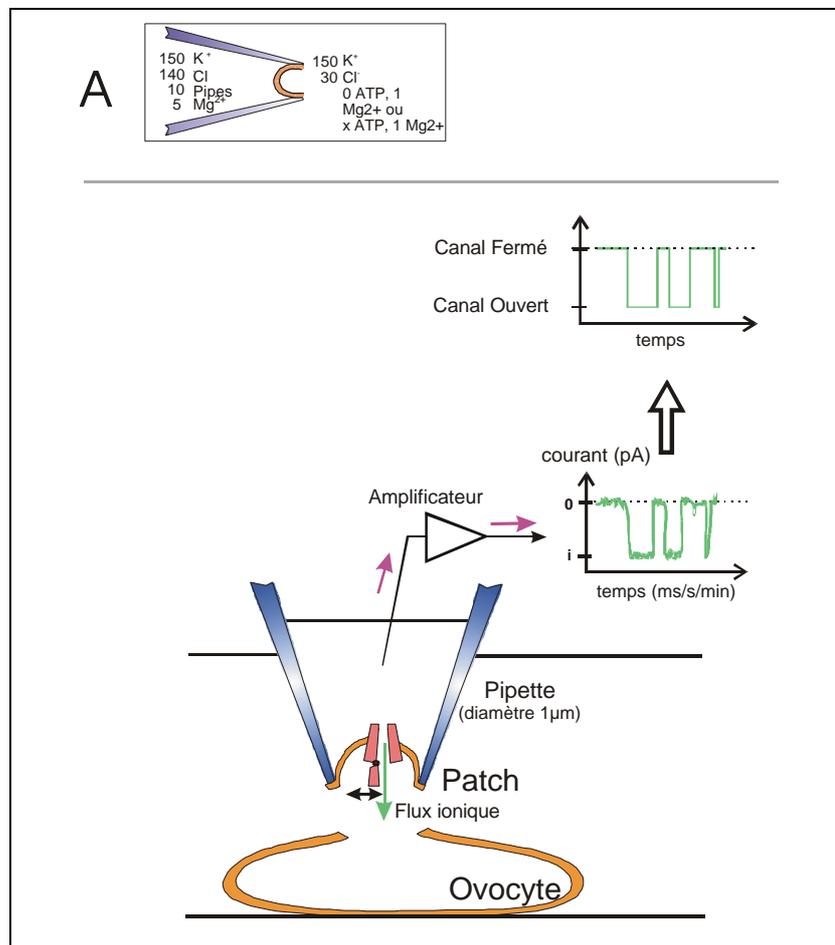
**Figure 34** : Photographie du système de perfusion, inséré dans la cage de Faraday

Les réservoirs contenant les différentes solutions expérimentales sont situés dans la partie supérieure gauche. La tête de perfusion est légèrement masquée à gauche de la plate-forme du microscope.

#### **5.3.4. Conditions expérimentales**

Deux à trois jours après la micro-injection, les ovocytes sont débarrassés manuellement de leur membrane de vitelline afin d'avoir accès à la membrane plasmique contenant les canaux  $K_{ATP}$  recombinants. Ils sont ensuite placés dans une solution isotonique contenant 1 mM d'ATP afin de protéger les canaux  $K_{ATP}$  en les fermant au moment de l'excision. La pipette, contenant une solution d'ions

potassiques, d'ions chlorures et d'ions magnésium (Figure 35), est appliquée sur l'ovocyte. Débute alors la phase de mesure de la résistance du "seal" aidé de quelques légères aspirations pour favoriser le contact entre les lipides et le verre. Une fois le "Giga-seal" formé, la pipette est éloignée rapidement, induisant l'excision d'un fragment de membrane comme décrit précédemment pour la configuration excisée inside-out. L'ovocyte est écarté par soucis de protection, avant de placer la tête de perfusion en face de la pipette. Chaque extrémité des capillaires correspond à une solution expérimentale donnée dont l'ordinateur pilote les changements par rotation de la tête. L'enregistreur DAT enregistre à la fois les courants traversant les canaux, et simultanément les signaux de changement de solution. Seule la valeur du potentiel de membrane n'est pas répertoriée, mais celle-ci a été invariablement maintenue à  $-50$  mV durant toutes nos expériences.



**Figure 35** : Conditions expérimentales de mesures de l'activité des canaux  $K_{ATP}$  par la technique de patch clamp en mode excisé inside-out.

**A)** composition du milieu de part et d'autre de la membrane. **B)** Principe du patch clamp en configuration excisée inside-out. En haut à droite, un exemple d'enregistrement des courants traversant un canal. Le diagramme théorique (partie supérieure) démontre la correspondance avec les états ouverts et fermés.

Dans nos conditions expérimentales, une déflexion vers le bas (courant "négatif") traduit une ouverture du canal, et par conséquent une activation lors de l'application des ouvreurs.

Nos mesures ont consisté à vérifier que les propriétés électrophysiologiques des canaux recombinants étaient identiques à celles des canaux natifs. Les caractéristiques prises en compte ont été : le courant unitaire, la conductivité, la constante d'inhibition par l'ATP, l'activation par l'ADP et le profil pharmacologique. Ce contrôle effectué, les résultats des expériences présentées dans le chapitre suivant sont principalement des mesures quantitatives du courant relatif observé dans différentes conditions expérimentales. Le courant relatif est un pourcentage du courant mesuré par rapport au courant obtenu en absence d'ATP (100% d'activation).

Toutes les solutions de perfusion sont conçues de manière à minimiser les courants "parasites". Le calcium (ajout de  $K_4$ EGTA dans certaines solutions) et le sodium sont absents. Les canaux  $Cl^-$  sont rendus "silencieux" en imposant une valeur de potentiel de membrane proche de celle du potentiel d'équilibre pour les ions chlorures ( $V_m \cong E_{Cl}$ ).

Les solutions sont tamponnées à pH 7,1 avec du  $K_2$ PIPES et ajustées avec du KOH. Le méthanesulfonate sert de contre-ion non perméable pour ajuster les concentrations d'ions potassiques à 150 mM.

## **RESULTATS ET INTERPRETATIONS**

## 6. RESULTATS ET INTERPRETATIONS

### 6.1. Interactions nucléotides-ouvreurs potassiques

#### 6.1.1. Principe

Les canaux  $K_{ATP}$  sont activés à la fois par l'ADP intracellulaire *via* le NBD2 du récepteur des sulfonylurées, et par les ouvreurs potassiques. Le but des travaux présentés ci-dessous est de déterminer si leurs actions sont reliées par une relation de cause à effet.

Pour ce faire nous avons principalement utilisé des associations d'ADP et de diazoxide (D'hahan et al., 1999), puis d'autres ouvreurs, et créé des mutants ponctuels dans le site de fixation des nucléotides pour en mesurer les conséquences sur l'action des ouvreurs potassiques (en cours de publication). Une partie des travaux présentés sont également le fruit d'une collaboration avec le laboratoire du Dr André Terzic (Division of Cardiovascular Diseases, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA) pour mettre en évidence l'activité ATPase des NBD et son implication dans la régulation endogène et pharmacologique des canaux  $K_{ATP}$ , notre contribution ayant consisté à caractériser l'effet de l'ouvreur Rilmakalim (HOE234) sur des canaux  $K_{ATP}$  de type sauvage ou mutés.

#### 6.1.2. Méthodes

Les mutants ont été réalisés par PCR avec des amorces contenant la mutation ponctuelle. Après transformation bactérienne chez *E. coli*, puis purification de l'ADNc par miniprep, vérification des clones par digestion aux enzymes de restriction, amplification de l'ADNc par culture bactérienne, purification de l'ADNc en plus grande quantité par midiprep, vérification de la mutation par séquençage, le gène codant pour la sous-unité SUR mutée est transcrit *in vitro* en ARNc puis micro-injecté avec l'ARNc de Kir6.2 dans les ovocytes de *Xénopes*. En deux jours d'incubation à 19°C, les canaux  $K_{ATP}$  recombinants sont alors caractérisables par la technique de patch clamp en mode excisé "inside-out", qui consiste, après dépouillement manuel des ovocytes de leur membrane vitelline, à extraire les canaux  $K_{ATP}$  présents dans une infime partie de la membrane plasmique, et ceci à l'aide d'une pipette de patch clamp pourvue d'une électrode de mesure. Les pico-courants traversant les canaux sont

déterminés à un voltage imposé de  $-50\text{mV}$ , et en condition symétrique de potassium dont la concentration est de  $140\text{ mM}$  de part et d'autre de la membrane excisée. Le courant entrant induit par l'ouverture des canaux est alors conventionnellement négatif.

La caractérisation du "profil" de régulation du canal s'effectue en appliquant différentes solutions sur sa face intracellulaire. Chaque activation se traduit par une déflexion du signal sous la ligne de base dont la valeur du courant unitaire<sup>1</sup> est d'environ  $3\text{ pA}$  dans nos conditions expérimentales de concentrations ioniques et de voltage imposé.

### **6.1.3. Résultats et interprétations<sup>2</sup>**

#### **6.1.3.1. Le diazoxide a également un effet sur SUR2A**

Le diazoxide est un hyperglycémiant utilisé dans le traitement de l'hyperinsulinémie hypoglycémiant infantile. Il agit en activant les canaux  $K_{\text{ATP}}$  pancréatiques composés de SUR1/Kir6.2. Par contre, il semble n'avoir aucun effet sur les canaux  $K_{\text{ATP}}$  de type cardiaque (SUR2A/Kir6.2). Or cet effet existe pourtant, mais n'est observable sur SUR2A qu'en présence de l'activateur endogène principal, le MgADP (*Figure 1* ; D'hahan et al., 1999). De manière surprenante, en présence de MgADP ( $100\text{ }\mu\text{M}$ ), SUR2A devient aussi sensible au diazoxide ( $300\text{ }\mu\text{M}$ ) que SUR1 (*Figure 1C* ; D'hahan et al., 1999), comme si le MgADP en qualité de co-facteur était nécessaire à l'action de cet ouvreur sur l'isoforme cardiaque.

Afin de déterminer la concentration minimale de MgADP nécessaire pour observer l'activation de SUR2A par le diazoxide, nous avons effectué des gammes de concentration en MgADP de  $1\text{ }\mu\text{M}$ ,  $10\text{ }\mu\text{M}$  et  $100\text{ }\mu\text{M}$ , et appliqué du diazoxide ( $300\text{ }\mu\text{M}$ ) pour chaque essai. Les résultats démontrent clairement (*Figure 2* ; D'hahan et al., 1999), que l'effet "co-facteur" du MgADP-diazoxide sur SUR2A apparaît entre  $10$  et  $100\text{ }\mu\text{M}$  d'ADP. Ces valeurs, relativement élevées par rapport aux concentrations intracellulaires moyennes d'ADP, ont pourtant un sens physiologique dans des conditions particulières d'hypoxie ou d'ischémie cardiaque. Cette

---

<sup>1</sup> courant unitaire: valeur du courant traversant un canal dans des conditions bien précises de concentrations ioniques et de potentiel de membrane.

<sup>2</sup> Afin de différencier les références des figures des articles de celles du mémoire de thèse, les références des figures des articles sont en italiques.

découverte explique certaines propriétés antihypertensives du diazoxide et les quelques effets secondaires de ce produit sur le système cardio-vasculaire.

Nous nous sommes également intéressés au rôle du magnésium dans ce mécanisme. Pour ce faire, nous avons comparé l'effet de l'ADP sur l'activation de SUR2A par le diazoxide, en présence et absence de  $Mg^{2+}$  (chélaté par 5mM d'EDTA) (*Figure 3* ; D'hahan et al., 1999). Les mesures confirment l'absence d'activation des canaux  $K_{ATP}$ , déjà connue, lorsque le magnésium ou d'autres cations divalents chimiquement proches sont chélatés. La découverte réside dans l'absence d'activation des canaux SUR2A/Kir6.2 en présence d'ADP et de diazoxide, en absence de magnésium. La perte d'activation des canaux par l'ADP a été expliquée par la faible affinité des NBD (site activateur des canaux par le MgADP et le MgATP) pour les nucléotides sans magnésium, tandis que ce déficit en cations métalliques n'influence aucunement l'affinité du site inhibiteur de Kir6.2 pour l'ATP et l'ADP, d'où cette puissante inhibition des canaux en présence d'EDTA. L'ajout de diazoxide aux solutions contenant l'ADP et l'EDTA n'induit aucune activation. La cause en est certainement le fait que l'ADP n'est pas ou peu fixé sur les NBD de SUR, ou bien que l'effet inhibiteur de l'ADP est renforcé par l'absence de  $Mg^{2+}$ , et masque l'effet activateur du diazoxide dans de telles conditions.

Afin de vérifier ces hypothèses, nous avons muté le NBD2 dans ses résidus les plus essentiels pour la fixation du MgADP, à savoir la lysine 1384 et l'aspartate 1469 de SUR2A (*Figure 4* ; D'hahan et al., 1999). La conséquence de ces mutations est la perte de toute activation induite par le MgADP, ainsi que celle induite par le diazoxide en présence de MgADP.

Ces résultats étant obtenus à partir de canaux  $K_{ATP}$  recombinants, ils pourraient être le résultat d'artéfacts liés à leur expression dans un système hétérologue. Le doute a été levé grâce à la collaboration avec le laboratoire de Dr André Terzic qui a mis en évidence le même phénomène d'activation par le diazoxide (300  $\mu$ M) en présence de MgADP (100  $\mu$ M), des canaux  $K_{ATP}$  natifs issus de myocytes ventriculaires de cochon d'Inde (*Figure 5* ; D'hahan et al., 1999). Et pour être absolument certain que la caractérisation des canaux hors de leur environnement cellulaire n'est pas source d'erreur, ils ont effectué les mêmes mesures en mode whole-cell (cellule entière) qui permet de mesurer les courants traversant les canaux de la cellule sans les exciser. Afin de mimer l'application de MgADP dans de telles conditions, ils ont traité les cellules avec du 2-4-dinitrofluorobenzène (DNFB) qui est

un inhibiteur spécifique de la créatine kinase. La concentration d'ADP intracellulaire est ainsi artificiellement augmentée, et l'ajout de diazoxide active alors les canaux  $K_{ATP}$  cardiaques natifs dans leur environnement cellulaire.

Par conséquent, l'action du diazoxide sur les canaux  $K_{ATP}$  de type cardiaque (SUR2A/Kir6.2) est démontrée à la fois sur les canaux recombinants et sur les canaux natifs en environnement cellulaire. Cependant cette activation n'est observable qu'en présence de d'ADP (100  $\mu$ M) lié au magnésium, et uniquement si celui-ci peut interagir physiquement et fonctionnellement avec le deuxième domaine de liaison des nucléotides de SUR2A. Il reste à déterminer de quelle manière le MgADP dévoile l'activation par le diazoxide des canaux  $K_{ATP}$  de type cardiaque. Est ce par ouverture du site de fixation du diazoxide ou par déblocage de la voie de transmission du signal d'activation ? La deuxième hypothèse est plus plausible car le diazoxide se fixe sur SUR2A en absence d'ADP.

# Pharmacological plasticity of cardiac ATP-sensitive potassium channels toward diazoxide revealed by ADP

Nathalie D'ahan\*<sup>†</sup>, Christophe Moreau\*<sup>†</sup>, Anne-Lise Prost\*, H el ene Jacquet\*, Alexey E. Alekseev<sup>‡</sup>, Andr e Terzic<sup>‡</sup>, and Michel Vivaudou\*<sup>§</sup>

\*Commissariat à l'Energie Atomique, D epartement de Biologie Moléculaire et Structurale, Laboratoire de Biophysique Moléculaire et Cellulaire, 38054, Grenoble, France; and <sup>‡</sup>Division of Cardiovascular Diseases, Departments of Medicine and Pharmacology, Mayo Clinic, Rochester, MN 55905

Edited by Lily Yeh Jan, University of California, San Francisco, CA, and approved August 4, 1999 (received for review May 6, 1999)

The pharmacological phenotype of ATP-sensitive potassium ( $K_{ATP}$ ) channels is defined by their tissue-specific regulatory subunit, the sulfonylurea receptor (SUR), which associates with the pore-forming channel core, Kir6.2. The potassium channel opener diazoxide has hyperglycemic and hypotensive properties that stem from its ability to open  $K_{ATP}$  channels in pancreas and smooth muscle. Diazoxide is believed not to have any significant action on cardiac sarcolemmal  $K_{ATP}$  channels. Yet, diazoxide can be cardioprotective in ischemia and has been found to bind to the presumed cardiac sarcolemmal  $K_{ATP}$  channel-regulatory subunit, SUR2A. Here, in excised patches, diazoxide (300  $\mu$ M) activated pancreatic SUR1/Kir6.2 currents and had little effect on native or recombinant cardiac SUR2A/Kir6.2 currents. However, in the presence of cytoplasmic ADP (100  $\mu$ M), SUR2A/Kir6.2 channels became as sensitive to diazoxide as SUR1/Kir6.2 channels. This effect involved specific interactions between MgADP and SUR, as it required  $Mg^{2+}$ , but not ATP, and was abolished by point mutations in the second nucleotide-binding domain of SUR, which impaired channel activation by MgADP. At the whole-cell level, in cardiomyocytes treated with oligomycin to block mitochondrial function, diazoxide could also activate  $K_{ATP}$  currents only after cytosolic ADP had been raised by a creatine kinase inhibitor. Thus, ADP serves as a cofactor to define the responsiveness of cardiac  $K_{ATP}$  channels toward diazoxide. The present demonstration of a pharmacological plasticity of  $K_{ATP}$  channels identifies a mechanism for the control of channel activity in cardiac cells depending on the cellular ADP levels, which are elevated under ischemia.

The potassium channel-opening drug (KCO) diazoxide has been in clinical use for the treatment of persistent hyperinsulinemia and hypertensive emergencies (1). Its pharmacodynamic properties have been related to the opening of ATP-sensitive potassium ( $K_{ATP}$ ) channels present in pancreatic  $\beta$ -cells and smooth muscle, where these channels regulate insulin secretion and vascular tone (2, 3). Plasma membrane  $K_{ATP}$  channels are constituted of an inward rectifier  $K^+$  channel, Kir6.2, associated with a regulatory subunit, the sulfonylurea receptor (SUR) (4–6). SUR, a member of the ATP-binding-cassette (ABC) transporter family, is the primary target of the KCOs (7–9). It is now established that the nucleotide-binding domains of SUR are tightly linked to the sites of action of KCOs because binding and effects of KCOs require hydrolyzable nucleotides and are compromised by mutations that, in other ABC transporters, impair the ability of these domains to bind and hydrolyze nucleotides (8–11). Several isoforms of SUR have been identified, including SUR1 in pancreatic  $\beta$ -cells (4, 5) and SUR2B in smooth muscle (12).

In addition to its hyperglycemic and hypotensive properties, diazoxide also has the ability to protect ischemic myocardial tissue (13), which expresses SUR2A, the presumed cardiac isoform of SUR (14). However, it has been difficult to demonstrate any stimulatory effect of diazoxide on plasmalemmal cardiac  $K_{ATP}$  channels, either in their native form (15) or after

reconstitution by heterologous coexpression of Kir6.2 and SUR2A (14, 16, 17). It has, therefore, become an established dogma that diazoxide does not act on cardiac sarcolemmal  $K_{ATP}$  channels (18–20). This has given weight to the hypothesis that diazoxide could produce some of its cardioprotective effects through activation of mitochondrial, rather than plasmalemmal,  $K_{ATP}$  channels (13, 21).

Binding experiments, however, have demonstrated that diazoxide can interact not only with SUR1, but also with SUR2A itself (8). Moreover, some reports have described a diazoxide-induced shortening of the cardiac action potential and/or an increase in whole-cell currents (13, 22, 23), suggesting that conditions exist where diazoxide could activate cardiac Kir6.2/SUR2A channels, much like pancreatic Kir6.2/SUR1 channels.

Here, we report that increase in cytoplasmic MgADP is the condition required for diazoxide to activate cardiac  $K_{ATP}$  channels, both native and recombinant. This implies that the transduction steps linking opener binding and channel opening are regulated by nucleotide interaction with the nucleotide-binding domains not only in the SUR1 protein (10, 11), but also in SUR2A. As the ischemic myocardium is characterized by increased levels of cytosolic ADP, an ADP-dependent activation of cardiac  $K_{ATP}$  channels by diazoxide could be relevant to its overall cardioprotective action.

A preliminary account of this work has been published in abstract form.<sup>¶</sup>

## Materials and Methods

**Xenopus Oocytes.** Mouse Kir6.2 (ref. 5; GenBank accession no. D50581), hamster SUR1 (ref. 4; GenBank accession no. L40623), and rat SUR2A (ref. 14; GenBank accession no. D83598) were subcloned in vectors derived from the *Xenopus* oocyte expression vector pGEMHE (24). After amplification and linearization, plasmid DNAs were transcribed *in vitro* by using the T7 mMessage mMachine kit (Ambion, Austin, TX). cRNAs were electrophoresed on formaldehyde gels, and concentrations were estimated from two dilutions by using RNA marker as a standard. Mutagenesis of SUR2A was done directly on the plasmid pGEMHE-SUR2A by PCR amplification of both DNA strands with complementary primers mutated to produce

This paper was submitted directly (Track II) to the PNAS office.

Abbreviations: KCO, potassium channel opener;  $K_{ATP}$  channel, ATP-sensitive potassium channel; SUR, sulfonylurea receptor; DNFB, 2,4-dinitro-1-fluorobenzene; NBD, nucleotide-binding domain.

<sup>¶</sup>N.D. and C.M. contributed equally to this work.

<sup>§</sup>To whom reprint requests should be addressed. E-mail: vivaudou@cea.fr.

<sup>¶</sup>Moreau, C., D'ahan, N., Jacquet, H., Alekseev, A. E., Terzic, A. & Vivaudou, M. (1999) *Biophys. J.* **76**, A413.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

the desired amino acid change (QuickChange site-directed mutagenesis kit; Stratagene). The primers, 5'-CCGGTAGTGG-GATGAGCTCTATCTCTGG-3' for the K1348M mutation and 5'-GCAGCATACTGATCATGAATGAGGCCACGGCC-TCC-3' for D1469N, also incorporated the new restriction sites *SacI* and *BclI* to facilitate screening of the correct constructs. These constructs were sequenced to confirm the mutations.

*Xenopus laevis* were anaesthetized with 3-aminobenzoic acid ethyl ester (1 g/liter of water). Part of one ovary was removed, the incision was sutured, and the animal was allowed to recover. Stage V or VI oocytes were defolliculated by an  $\approx 60$ -min incubation at 19°C with 2 mg/ml type A collagenase (Sigma). Selected oocytes were injected the next day with 50 nl of water containing  $\approx 2$  ng of Kir6.2 cRNA and with  $\approx 6$  ng of cRNA encoding SUR1 or SUR2A. They were stored at 19°C in a modified Barth's solution with (in mM): 1 KCl, 0.82 MgSO<sub>4</sub>, 88 NaCl, 2.4 NaHCO<sub>3</sub>, 0.41 CaCl<sub>2</sub>, 0.3 Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, and 16 HEPES (pH 7.4) supplemented with 100 units/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, and 100  $\mu$ g/ml gentamycin.

Three to 15 days after injection, oocytes were devitellinized, and heterologously expressed K<sub>ATP</sub> channels were characterized by the patch-clamp technique in the excised inside-out configuration (25) by using techniques similar to those we used to record native frog skeletal muscle K<sub>ATP</sub> channels (26, 27).

Conditions were designed to optimize recording of K<sub>ATP</sub> currents and minimize contributions by endogenous oocyte Cl<sup>-</sup> currents. Patch pipettes (2–10 M $\Omega$ ) contained (in mM) 154 K<sup>+</sup>, 146 Cl<sup>-</sup>, 5 Mg<sup>2+</sup>, and 10 piperazine-*N,N'*-bis(2-ethane-sulfonic acid) (Pipes)-KOH (pH 7.1). The cytoplasmic face of the patch was bathed in solutions that contained (in mM) 174 K<sup>+</sup>, 40 Cl<sup>-</sup>, 1 EGTA, 10 Pipes-KOH (pH 7.1), and methanesulfonate<sup>-</sup> as the remaining anions. Except where noted, Mg<sup>2+</sup> was 1 mM. The membrane potential was maintained at -50 mV.

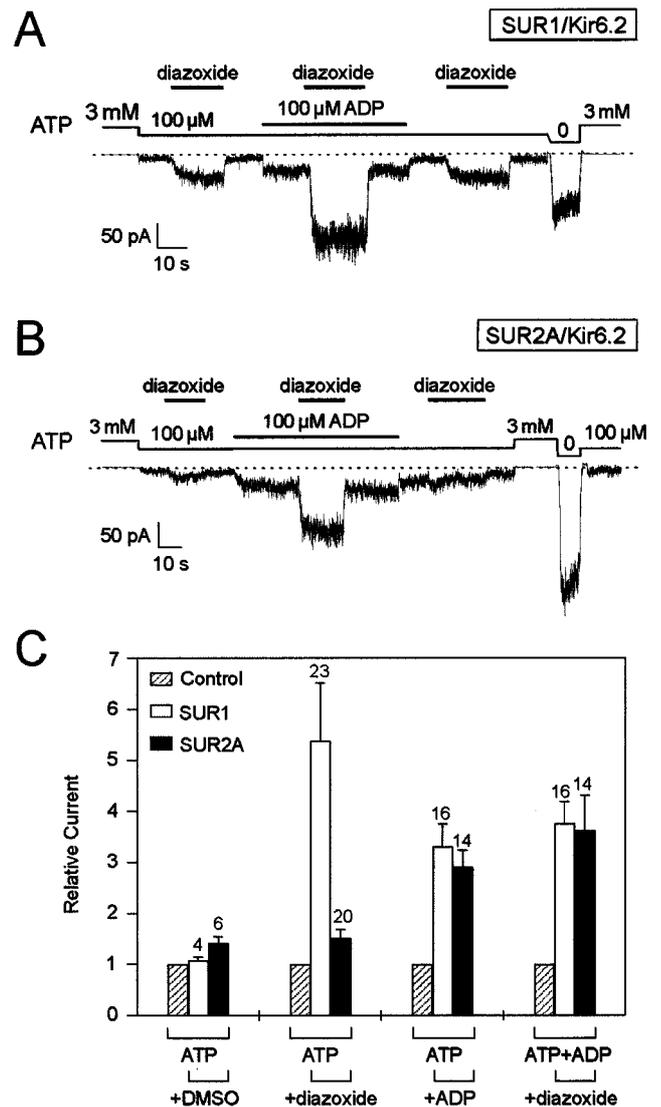
**Cardiac Myocytes.** Guinea pig ventricular myocytes were isolated by enzymatic dissociation as described (28). For inside-out patch-clamp recordings, fire-polished pipettes (5–7 M $\Omega$ ) contained (in mM): 140 KCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 5 HEPES-KOH (pH 7.3), whereas the bath solution had (in mM): 140 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 5 EGTA, 5 HEPES-KOH (pH 7.3). Currents were monitored on-line on a high-gain digital storage oscilloscope (VC-6025; Hitachi, Tokyo) and stored on tape with a digital data recorder (VR-10; Instrutech, Mineola, NY). Currents were filtered off-line at 1 kHz with a Bessel filter (Frequency Devices 902; Haverhill, MA), sampled at 150- $\mu$ s intervals, and analyzed by using the BIOQUEST software (28). For whole-cell recordings, cardiomyocytes were superfused with a Tyrode solution containing (in mM): 136.5 NaCl, 5.4 KCl, 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 0.53 MgCl<sub>2</sub>, 5.5 glucose, and 5.5 HEPES-NaOH (pH 7.4). Pipettes ( $\approx 5$  M $\Omega$ ) for whole-cell recording contained (in mM): 140 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 2 ATP, 5 EGTA, and 10 HEPES-KOH (pH 7.3).

**Materials.** ATP and ADP (potassium salts; Sigma), diazoxide (100 mM stock in DMSO; Sigma), oligomycin (a mixture of oligomycins A, B, and C; 1 mg/ml stock in DMSO; Sigma), and 2, 4-dinitro-1-fluorobenzene (DNFB; Fluka) were added as specified. All recordings were done at room temperature ( $\approx 22^\circ\text{C}$ ). Results are displayed as mean  $\pm$  SEM.

## Results

**Activation of SUR2A/Kir6.2 by Diazoxide in the Presence of ADP.** Within 3 days after injection of *Xenopus* oocytes with cRNAs coding for Kir6.2 and either SUR1 or SUR2A, macroscopic K<sub>ATP</sub> currents could be recorded in excised inside-out patches. SUR1 and SUR2A/Kir6.2 channels exhibited similar sensitivities to inhibition by intracellular ATP, with 10–20  $\mu$ M ATP causing half-inhibition on average (9).

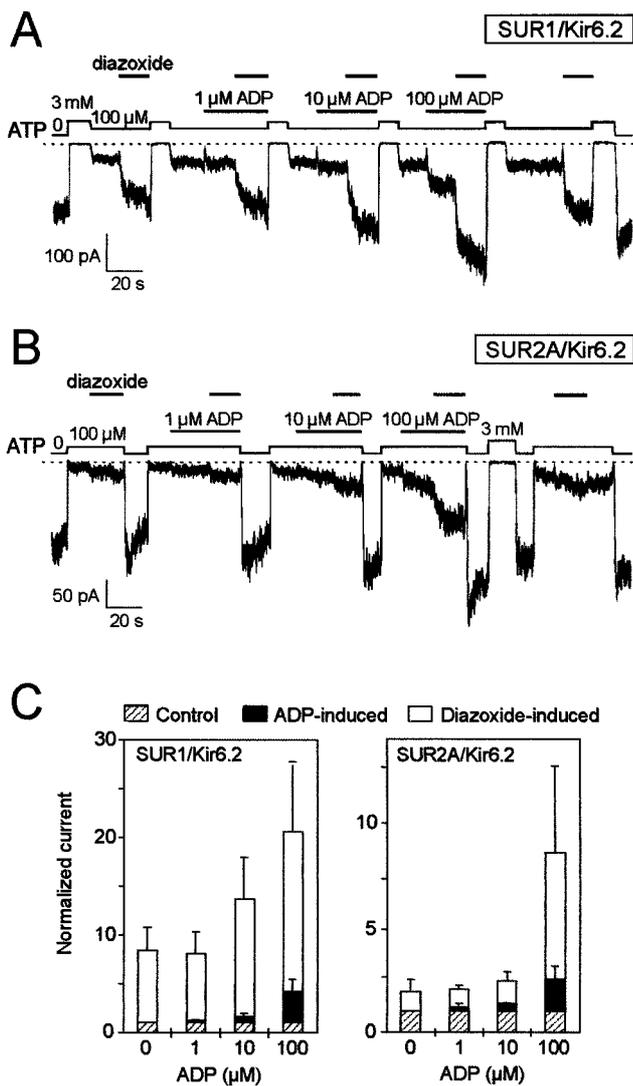
When currents were blocked to about 15% of their maximal values by 100  $\mu$ M ATP, diazoxide (300  $\mu$ M) caused a 5-fold increase in SUR1/Kir6.2 currents but had little effects on



**Fig. 1.** Diazoxide activates SUR2A/Kir6.2 K<sub>ATP</sub> channels in the presence of ADP. (A) Representative current trace recorded at -50 mV from an inside-out patch excised from an oocyte expressing Kir6.2 and SUR1. (B) *Idem* with SUR2A. (C) Average effects on SUR1/Kir6.2 and SUR2A/Kir6.2 currents of, from left to right, the vehicle DMSO, diazoxide in the absence of ADP, ADP, and diazoxide in the presence of ADP. For the latter, control represents the current measured in the presence of ADP. Numbers above bars indicate the number of patches tested. Responses were recorded as in A and B in the presence of 100  $\mu$ M ATP and 1 mM Mg<sup>2+</sup> by using 100  $\mu$ M ADP, 300  $\mu$ M diazoxide, and 0.3% DMSO.

SUR2A/Kir6.2 currents (Fig. 1). However, in the presence of 100  $\mu$ M ADP, diazoxide caused a robust increase in current, regardless of whether SUR1 or SUR2A was expressed. At 100  $\mu$ M, ADP produced a 3-fold stimulation of ATP-inhibited SUR1 or SUR2A/Kir6.2 currents. On top of this stimulation, diazoxide further activated currents more than 3-fold ( $3.8 \pm 0.4$  for SUR1 and  $3.6 \pm 0.7$  for SUR2A). Therefore, ADP uncovers a previously unrecognized ability of SUR2A/Kir6.2 channels to respond to diazoxide.

**Nucleotide Requirements for Diazoxide Activation of SUR2A/Kir6.2 Channels.** For SUR2A/Kir6.2 channels, there is a sharp dependence of the effect of diazoxide on the concentration of ADP (Fig. 2B), with channel activation by diazoxide becoming significant only at or above 100  $\mu$ M ADP. For SUR1/Kir6.2

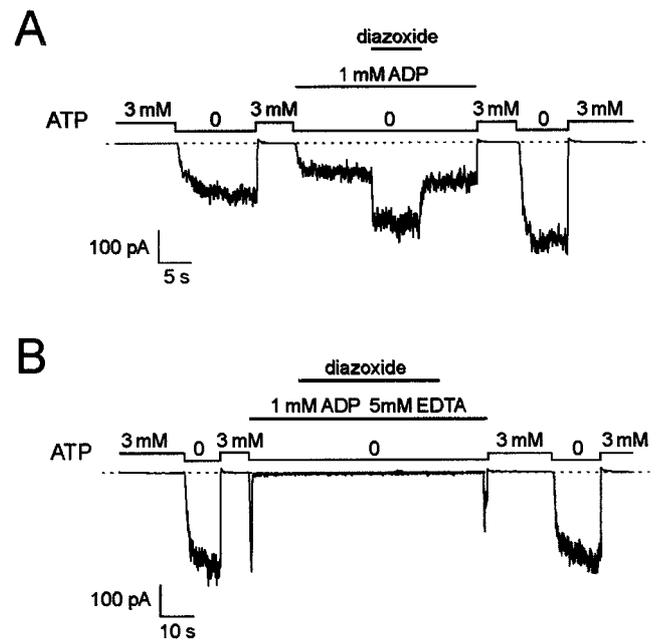


**Fig. 2.** ADP concentration dependence of diazoxide activation of SUR2A/Kir6.2  $K_{ATP}$  channels. (A) Effects of diazoxide (300  $\mu$ M) at increasing concentrations of ADP on SUR1/Kir6.2 channels. (B) *Idem* with SUR2A. (C) Cumulative histograms showing the normalized currents induced by increasing concentrations of ADP and by diazoxide at each of those concentrations of ADP. Average data for SUR1/Kir6.2 (Left) and SUR2A/Kir6.2 (Right) were obtained from three patches each by using the protocols of A and B.

channels (Fig. 2A), diazoxide-induced activity is already vigorous in the absence of added ADP and is enhanced progressively by further addition of 10 and 100  $\mu$ M ADP. For both channel isoforms, the sensitivity to ADP alone appeared equivalent, with slight activation at 10  $\mu$ M and large activation at 100  $\mu$ M (Fig. 2C).

The experiments described in Figs. 1 and 2 were performed with both ATP and  $Mg^{2+}$  present. In the absence of ATP and presence of  $Mg^{2+}$  (1 mM), when the concentration of ADP was raised to 1 mM, which partially blocked  $K_{ATP}$  current, diazoxide (300  $\mu$ M) activated SUR2A/Kir6.2 currents to the maximum level observed in the absence of nucleotides (Fig. 3A; fold increase =  $2.03 \pm 0.4$ ;  $n = 5$ ). After removal of  $Mg^{2+}$  and in the presence of EDTA, diazoxide could not increase channel activity despite the presence of 1 mM ADP (Fig. 3B), suggesting that MgADP, rather than ADP alone, is required for opener-induced activation of SUR2A/Kir6.2 channels.

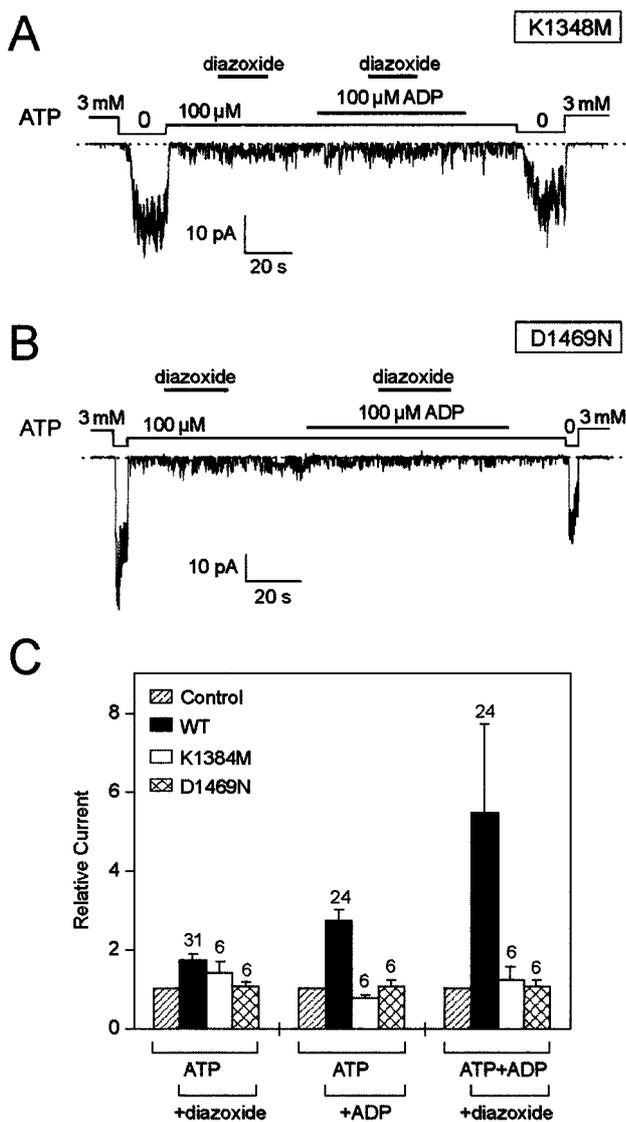
**Mutations in the Second NBD of SUR2A Eliminate ADP and Diazoxide Activation.** ATP-binding-cassette transporters contain two cytoplasmic NBDs, NBD1 and NBD2, with Walker A and B



**Fig. 3.** Diazoxide activation of SUR2A/Kir6.2  $K_{ATP}$  channels does not require the presence of ATP but requires  $Mg^{2+}$ . (A) Activation by diazoxide (300  $\mu$ M) of SUR2A/Kir6.2  $K_{ATP}$  channels in the presence of ADP (1 mM) as the only blocking nucleotide with 1 mM  $Mg^{2+}$ . In five different patches, current in diazoxide relative to control was  $2.03 \pm 0.37$ . (B) *Idem* in the absence of  $Mg^{2+}$  with 5 mM EDTA to chelate contaminant  $Mg^{2+}$ . Both traces are from the same patch.

motifs forming an ATP-binding pocket (29). The highly conserved Walker A lysine and Walker B aspartate are important for ATP binding and/or hydrolysis, as the lysine residue interacts with the  $\beta$ -phosphate of ATP, whereas the aspartate residue coordinates with a  $Mg^{2+}$  ion to interact with the  $\beta$ - and  $\gamma$ -phosphates of ATP (30). In SUR1, mutations of these residues in both NBDs disrupt the channel response to ADP and diazoxide (10, 11). Mutations in NBD1 eliminate ATP binding, whereas equivalent mutations in NBD2 only impair the ability of MgADP to antagonize ATP binding (31), suggesting that the NBD2 domain is responsible for the interaction between SUR1 and MgADP. The role of NBD2 in MgADP-dependent diazoxide action on SUR2A/Kir6.2 channels was directly tested in channels with mutated Walker A lysine (K1348M) and Walker B aspartate (D1469N) residues. These two SUR2A mutants, when coexpressed with Kir6.2, produced functional channels with a sensitivity to ATP similar to that observed in the wild type (Fig. 4). However, these mutants produced channels with an impaired sensitivity to MgADP (Fig. 4), consistent with a critical role for NBD2 in mediating the interaction of ADP with SUR2A. In these mutants, the lack of sensitivity to ADP was associated with the inability of diazoxide to activate the channels alone or in the presence of MgADP (Fig. 4).

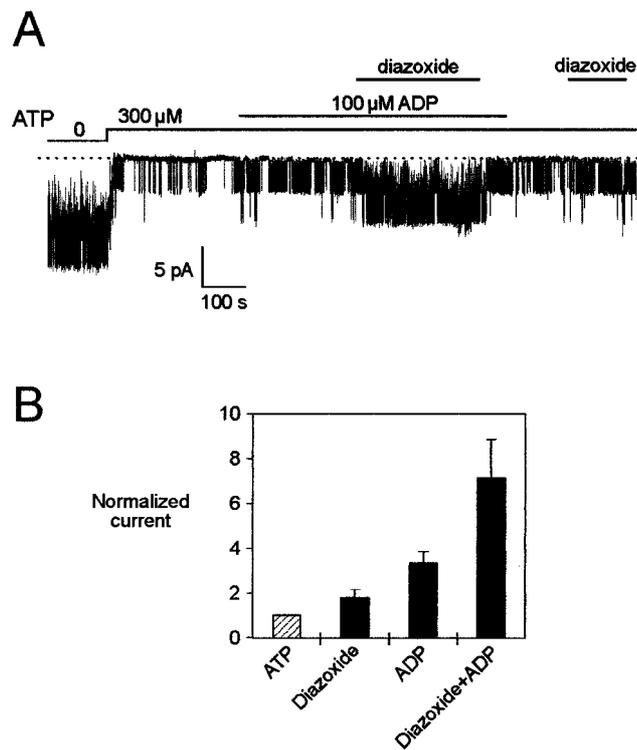
**Diazoxide Activates Native Cardiac  $K_{ATP}$  Channels.** SUR2A is the proposed cardiac isoform of SUR (14–17), and the ADP requirement for diazoxide-induced channel activation should be reproducible with the channel expressed in its native environment. Diazoxide was therefore tested on  $K_{ATP}$  channels in membranes of ventricular myocytes. Like SUR2A/Kir6.2 channels, native cardiac  $K_{ATP}$  channels were blocked by 300  $\mu$ M ATP and activated by 100  $\mu$ M ADP (Fig. 5A). In the presence of ADP, diazoxide (300  $\mu$ M) produced significant increase in channel activity, which was only marginal in the absence of ADP. On average, the effect of diazoxide in the absence of ADP was equivalent in native channels and recombinant SUR2A/Kir6.2



**Fig. 4.** Point mutations in Walker A and Walker B motifs of the second nucleotide binding domain of SUR2A impair the ability of ADP to promote diazoxide activation. (A) Lack of effect of diazoxide (300  $\mu$ M) and ADP on  $K_{ATP}$  channels from an oocyte expressing wild-type Kir6.2 and mutated SUR2A with a K1348M mutation in the second Walker A motif. (B) *Idem* with the Walker B mutant D1469N of SUR2A. (C) Average effects of diazoxide, ADP, and diazoxide plus ADP on wild-type and mutant SUR2A/Kir6.2 currents.

channels (fold increases of  $1.79 \pm 0.35$ ,  $n = 8$ , and  $1.51 \pm 0.14$ ,  $n = 20$ , respectively). Such effect could be because of vehicle (see Fig. 1C) and/or possible presence of contaminant ADP in the ATP solutions. In the presence of ADP, diazoxide in native channels produced significant activation, albeit the relative increase in native channel activity was smaller than that observed in recombinant channels (fold increases of  $2.15 \pm 0.52$ ,  $n = 8$ , vs.  $3.56 \pm 0.71$ ,  $n = 14$ ). This apparent difference in efficacy might not reflect a real variance in the responsiveness of native vs. recombinant channels. It could be because of saturation of the effect of diazoxide in native channels operating, in the presence of ADP, at levels beyond which even more effective activators could not produce a more pronounced channel activation.

In contrast to inside-out patches, in the intact cardiomyocytes,  $K_{ATP}$  channels are coupled to intracellular ATP-consuming/ATP-generating systems (32). Under such conditions, the effi-

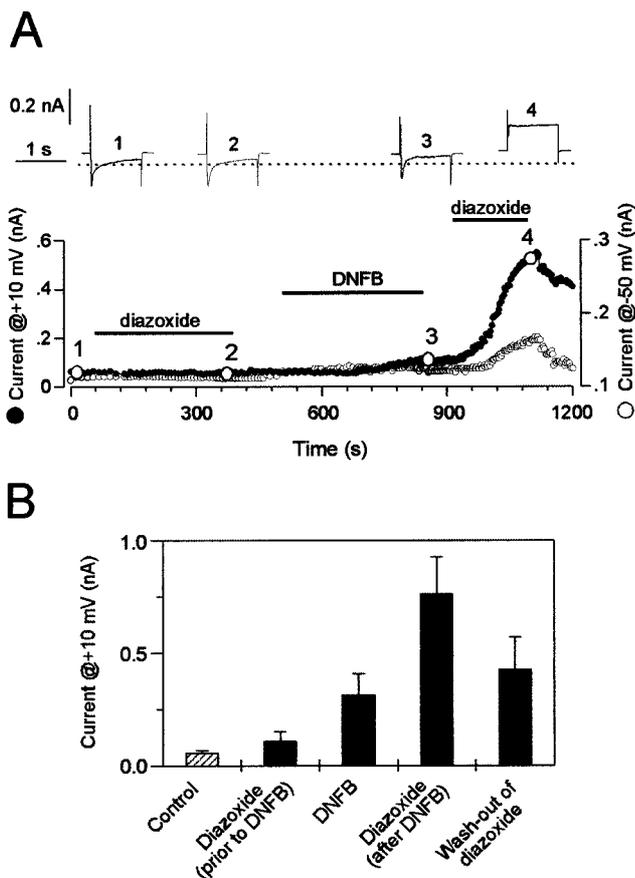


**Fig. 5.** ADP promotes diazoxide activation of native cardiac  $K_{ATP}$  channels. (A) Current tracing recorded at  $-60$  mV in an inside-out patch excised from a guinea pig ventricular myocyte. (B) Normalized current observed in eight patches in the presence of ADP (100  $\mu$ M), diazoxide (300  $\mu$ M), or both. To reduce errors because of low channel activity, mean current was estimated from  $nP_o$  values ( $n$ , number of channels;  $P_o$ , open probability) obtained by analysis of gating transitions (28).

ciacy of diazoxide will depend on the availability of ADP at the channel site. In cardiomyocytes treated with the mitochondrial ATP-synthase inhibitor oligomycin, diazoxide did not activate  $K_{ATP}$  channel current (Fig. 6). This suggests that, in addition to mitochondrial ADP consumption, other catalytic activities recycle ADP into ATP. This may include creatine kinase, which is responsible for 90% of ATP turnover in cardiac cells (33). Therefore, we added to oligomycin-treated cardiomyocytes the creatine kinase inhibitor DNFB, which, on its own, induced modest channel activation (Fig. 6), suggesting that, with inhibited creatine kinase, levels of ADP were raised. Further application of diazoxide produced vigorous increase in outward current, in line with a diazoxide-induced activation of  $K_{ATP}$  current (Fig. 6). The diazoxide-induced outward current partially reversed on washout (Fig. 6A and B) and was observed at both  $+10$  mV, where outward and inward current components are not separated, and  $-50$  mV, where the inward current component is essentially inactivated (Fig. 6A). Thus, after inhibition of cellular ADP-utilizing systems, diazoxide can enhance whole-cell  $K_{ATP}$  current.

## Discussion

Diazoxide has a special place among KCOs, as it displays an apparently high selectivity for pancreatic  $\beta$ -cell and smooth muscle over cardiac  $K_{ATP}$  channels. In isolated patches from cardiac muscle cells or from cells expressing recombinant SUR2A/Kir6.2 channels, a stimulatory effect of diazoxide has never been reported to date, leading to the consensus opinion that cardiac sarcolemmal  $K_{ATP}$  channels are insensitive to this drug (18–21).



**Fig. 6.** Diazoxide enhances whole-cell  $K^+$  current in cardiomyocytes after treatment with DNFB, a creatine kinase inhibitor. (A) Time course of the diazoxide ( $300 \mu\text{M}$ ) response of steady state whole-cell outward currents before and after application of DNFB ( $100 \mu\text{M}$ ). Under conditions of physiological ionic concentration gradients with internal  $2 \text{ mM}$  ATP, steady state currents were measured at the end of 1-s pulses to  $+10 \text{ mV}$  from a holding potential of  $-50 \text{ mV}$  (●). In addition, the baseline current measured at  $-50 \text{ mV}$  is shown (○). Original current traces corresponding to numbered circles are shown as *insets*. Cardiomyocytes were pretreated with oligomycin ( $1 \text{ mg/ml}$ ) for 5 min to disrupt mitochondrial function and prevent effects of diazoxide through mitochondria. (B) Average currents measured at  $+10 \text{ mV}$  from eight cardiomyocytes.

Present results demonstrate that diazoxide can produce activation of cardiac  $K_{\text{ATP}}$  channels with ADP serving as an essential cofactor in this phenomenon. Experimental evidence was obtained for both recombinant and native cardiac  $K_{\text{ATP}}$  channels. In the absence of ADP, diazoxide caused only a slight activation of cardiac  $K_{\text{ATP}}$  channels, which could have been overlooked in previous studies. This activation could have arisen from an effect of the vehicle, in our case DMSO, or from the presence of contaminant ADP, which cannot be avoided when solutions containing ATP are used. In the presence of  $100 \mu\text{M}$  ADP, diazoxide produced a large activation comparable to that seen with pancreatic Kir6.2/SUR1 channels. The concentration threshold for this effect of ADP was between  $10$  and  $100 \mu\text{M}$ . This could explain the lack of clear effects of diazoxide on membrane currents from resting myocytes where the concen-

tration of free ADP is maintained below the micromolar range by a number of ADP-utilizing processes, including the creatine kinase reaction (34). Only after blocking ADP consumption could we observe a consistent increase in whole-cell  $K_{\text{ATP}}$  currents by diazoxide. To ensure that diazoxide acted directly on sarcolemmal channels and not indirectly via mitochondrial channels (13, 21, 35), in those experiments, cells were pretreated with oligomycin to disrupt mitochondrial function. The evidence thus shows that diazoxide will increase  $K^+$  currents in heart muscle only in conditions of elevated ADP levels as might occur under ischemic conditions (35). This preference for sarcolemmal channels in metabolically compromised cells, combined with the activation of mitochondrial channels (13, 21, 36), could contribute to the cardioprotective efficacy of diazoxide.

In terms of molecular structure, the observed correlation between native channels and SUR2A/Kir6.2 supports the hypothesis that these two entities are identical (14, 16, 37). Experiments showing that diazoxide can displace the binding of a radiolabeled opener from SUR2A (8) imply that SUR2A possesses a diazoxide binding site like other known isoforms of the SUR do. As binding experiments (8) were done in the absence of ADP, it would appear that ADP facilitates diazoxide activation by acting on the coupling between diazoxide and channel opening, rather than on the binding step. That  $\text{Mg}^{2+}$  is required, but ATP is neither sufficient nor necessary to promote diazoxide action suggests, first, that ADP, produced through a possible (though still undemonstrated) hydrolysis of ATP by SUR, cannot replace exogenously supplied ADP, and second, that the mechanism involves the second NBD, NBD2, of SUR2A, which preferentially binds  $\text{MgADP}$  (31). Corroborating this latter conclusion, mutations of the conserved lysine (to methionine) and aspartate (to asparagine) residues of the Walker A and B motifs of NBD2 abolished both ADP and diazoxide activation. In SUR1, the corresponding lysine-to-methionine mutation cancelled the activatory effects of ADP but not of diazoxide (10), suggesting that an obligatory link between ADP and diazoxide exists in SUR2A but not SUR1.

In summary, we provide evidence for the critical role of intracellular ADP in defining the response of cardiac  $K_{\text{ATP}}$  channel toward diazoxide. That cardiac  $K_{\text{ATP}}$  channels can be rendered diazoxide-sensitive provides a mechanistic basis for the action of this opener on cardiac sarcolemmal  $K_{\text{ATP}}$  channels. Along with previous reports of nucleotide diphosphate-dependent action of channel openers (10, 11, 38), as well as blockers (29, 39–42), the present study demonstrates a fundamental role for ADP in defining the pharmacological plasticity of  $K_{\text{ATP}}$  channels.

We are grateful to Dr. J. Bryan (Houston, TX) for hamster SUR1, Dr. S. Seino (Chiba, Japan) for mouse Kir6.2 and rat SUR2A, and Dr. D. Logothetis (New York, NY) for providing vector pGEMHE. This work was made possible by grants from Association Francaise contre les Myopathies, Association Francaise de Lutte contre la Mucoviscidose with additional support provided by Commissariat à l'Énergie Atomique, Centre National de la Recherche Scientifique, the Miami Heart Research Institute, and the Ruth and Bruce Rappaport Program in Vascular Biology and Gene Delivery at the Mayo Foundation. N.D., H.J., and C.M. were supported by a fellowship from La Société des Amis des Sciences, a studentship from Association pour la Recherche contre le Cancer, and a studentship from La Ligue contre le Cancer, respectively. A.E.A. is a recipient of a fellowship from the American Heart Association, Northland Affiliate.

1. Paulsian, R. (1978) *Int. Anesthesiol. Clin.* **16**, 201–237.
2. Trube, G., Rorsman, P. & Ohno-Shosaku, T. (1986) *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **407**, 493–499.
3. Standen, N. B., Quayle, J. M., Davies, N. W., Brayden, J. E., Huang, Y. & Nelson, M. T. (1989) *Science* **245**, 177–180.

4. Aguilar-Bryan, L., Nichols, C. G., Wechsler, S. W., Clement, J. P., Boyd, A. E., Gonzalez, G., Herrerasosa, H., Nguy, K., Bryan, J. & Nelson, D. A. (1995) *Science* **268**, 423–426.
5. Inagaki, N., Gono, T., Clement, J. P., Namba, N., Inazawa, J., Gonzalez, G., Aguilar-Bryan, L., Seino, S. & Bryan, J. (1995) *Science* **270**, 1166–1170.

6. Lorenz, E., Alekseev, A. E., Krapivinsky, G. B., Carrasco, A. J., Clapham, D. E. & Terzic, A. (1998) *Mol. Cell. Biol.* **18**, 1652–1659.
7. Tucker, S. J., Gribble, F. M., Zhao, C., Trapp, S. & Ashcroft, F. M. (1997) *Nature (London)* **387**, 179–183.
8. Schwanstecher, M., Sieverding, C., Dorschner, H., Gross, I., Aguilar-Bryan, L., Schwanstecher, C. & Bryan, J. (1998) *EMBO J.* **17**, 5529–5535.
9. D'hahan, N., Jacquet, H., Moreau, C., Catty, P. & Vivaudou, M. (1999) *Mol. Pharmacol.*, **56**, 308–315.
10. Gribble, F. M., Tucker, S. J. & Ashcroft, F. M. (1997) *EMBO J.* **16**, 1145–1152.
11. Shyng, S. L., Ferrigni, T. & Nichols, C. G. (1997) *J. Gen. Physiol.* **110**, 643–654.
12. Isomoto, S., Kondo, C., Yamada, M., Matsumoto, S., Higashiguchi, O., Horio, Y., Matsuzawa, Y. & Kurachi, Y. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 24321–24324.
13. Garlid, K. D., Paucek, P., Yarov-Yarovsky, V., Murray, H. N., Darbenzio, R. B., D'Alonzo, A. J., Lodge, N. J., Smith, M. A. & Grover, G. J. (1997) *Circ. Res.* **81**, 1072–1082.
14. Inagaki, N., Gono, T., Clement, J. P., Wang, C. Z., Aguilar-Bryan, L., Bryan, J. & Seino, S. (1996) *Neuron* **16**, 1011–1017.
15. Faivre, J. F. & Findlay, I. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* **984**, 1–5.
16. Babenko, A. P., Gonzalez, G., Aguilar-Bryan, L. & Bryan, J. (1998) *Circ. Res.* **83**, 1132–1143.
17. Okuyama, Y., Yamada, M., Kondo, C., Satoh, E., Isomoto, S., Shindo, T., Horio, Y., Kitakaze, M., Hori, M. & Kurachi, Y. (1998) *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **435**, 595–603.
18. Isomoto, S. & Kurachi, Y. (1997) *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **8**, 1431–1446.
19. Aguilar-Bryan, L., Clement, J. P., Gonzalez, G., Kunjilwar, K., Babenko, A. & Bryan, J. (1998) *Physiol. Rev.* **78**, 227–245.
20. Seino, S. (1999) *Annu. Rev. Physiol.* **61**, 337–362.
21. Liu, Y., Sato, T., O'Rourke, B. & Marban, E. (1998) *Circulation* **97**, 2463–2469.
22. Ciampolillo, F., Tung, D. E. & Cameron, J. S. (1992) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **260**, 254–260.
23. Sato, T., Wu, B., Nakamura, S., Kiyosue, T. & Arita, M. (1993) *Br. J. Pharmacol.* **108**, 549–556.
24. Liman, E. R., Tytgat, J. & Hess, P. (1992) *Neuron* **9**, 861–871.
25. Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. & Sigworth, F. J. (1981) *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **391**, 85–100.
26. Vivaudou, M. & Forestier, C. (1995) *J. Physiol. (London)* **486**, 629–645.
27. Forestier, C., Pierrard, J. & Vivaudou, M. (1996) *J. Gen. Physiol.* **107**, 489–502.
28. Alekseev, A. E., Brady, P. A. & Terzic, A. (1998) *J. Gen. Physiol.* **111**, 381–394.
29. Higgins, C. F. (1992) *Annu. Rev. Cell Biol.* **8**, 67–113.
30. Hung, L. W., Wang, I. X., Nikaido, K., Liu, P. Q., Ames, G. F.-L. & Kim, S. H. (1998) *Nature (London)* **396**, 703–707.
31. Ueda, K., Inagaki, N. & Seino, S. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 22983–22986.
32. Dzeja, P. P. & Terzic, A. (1998) *FASEB J.* **12**, 523–529.
33. Dzeja, P. P., Vitkevicius, K. T., Redfield, M. M., Burnett, J. C. & Terzic, A. (1999) *Circ. Res.* **84**, 1137–1143.
34. Radda, G. K. (1986) *Science* **233**, 640–645.
35. Holmuhamedov, E. L., Jovanovic, S., Dzeja, P. P., Jovanovic, A. & Terzic, A. (1998) *Am. J. Physiol.* **44**, H1567–H1576.
36. Holmuhamedov, E. L., Wang L. & Terzic A. (1999) *J. Physiol. (London)* **519**, 347–360.
37. Lorenz, E. & Terzic, A. (1999) *J. Mol. Cell. Cardiol.* **31**, 425–434.
38. Jahangir, A., Terzic, A. & Kurachi, Y. (1994) *Cardiovasc. Res.* **28**, 831–835.
39. Venkatesh, N., Lamp, S. T. & Weiss, J. N. (1991) *Circ. Res.* **69**, 623–637.
40. Terzic, A., Findlay, I., Hosoya, Y. & Kurachi, Y. (1994) *Neuron* **12**, 1049–1058.
41. Jovanovic, A., Zhang, S. C., Alekseev, A. E. & Terzic, A. (1996) *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **431**, 800–802.
42. Brady, P. A., Alekseev, A. E. & Terzic, A. (1998) *Circ. Res.* **82**, 272–278.

### 6.1.3.2. L'activité ATPase du récepteur des sulfonylurées

Ce travail a été initié par le laboratoire du Pr André Terzic, auquel nous avons participé pour la caractérisation des canaux mutants. Le but est de mettre en évidence l'activité ATPase des domaines de liaison des nucléotides (Bienengraeber et al., 2000). Pour ce faire, nous avons utilisé des NBD purifiés sur lesquels nous avons mesuré la production de phosphate inorganique [ $^{32}\text{P}$ ]P<sub>i</sub>, issu de l'hydrolyse d'ATP[ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ], après séparation par chromatographie en couche mince (*Figure 1* ; Bienengraeber et al., 2000). Cette technique révèle une activité ATPase des NBD qui est supérieure dans le NBD2 purifié par rapport au NBD1 purifié. Le  $V_{\text{max}}$  est de 35,4 nmol/min/mg et le  $K_m$  de 4,4 mM pour le NBD2 purifié. Ces valeurs sont proches de celles observées sur d'autres transporteurs ABC. Les autres preuves de l'activité ATPase des NBD, sont la diminution de production du [ $^{32}\text{P}$ ]P<sub>i</sub> en absence de magnésium et lors de mutations des résidus catalytiques du NBD2.

A partir de cette démonstration d'une activité ATPase des NBD, se pose la question suivante : est elle impliquée dans le mécanisme de régulation du canal par les nucléotides ? Pour y répondre, nous avons commencé par démontrer, en dosant l'ADP et l'ATP par HPLC, que les canaux  $K_{\text{ATP}}$  cardiaques natifs étaient capables d'hydrolyser l'ATP (*Figure 2A* ; Bienengraeber et al., 2000). Puis que la diminution artificielle de la concentration d'ADP intracellulaire, par ajout de créatine kinase, augmentait la sensibilité des canaux à l'ATP lors de mesures par patch clamp en configuration "cell-attached" (*Figure 2B,C* ; Bienengraeber et al., 2000). Même constatation lorsque le site de liaison du MgADP est muté sur le récepteur des sulfonylurées (*Figure 2D* ; Bienengraeber et al., 2000). Par conséquent, l'activation des canaux  $K_{\text{ATP}}$  est régulée par l'ADP, ADP qui peut être produit par le NBD2 en hydrolysant l'ATP.

Cette hydrolyse de l'ATP est elle influencée par les ouvreurs potassiques ? Les mesures de production d'ADP en leur présence semblent le démontrer (*Figure 3A* ; Bienengraeber et al., 2000), cette stimulation de l'activité ATPase étant plus ou moins importante suivant le type d'ouvreur. De plus, la courbe d'activation des canaux  $K_{\text{ATP}}$  est superposable à la courbe d'activité ATPase pour la même gamme de concentration de rilmakalim. Cette augmentation de l'activité ATPase en présence d'ouvreurs, disparaît dans des solutions privées de magnésium, et elle n'est pas due à la présence d'autres ATPases ou phosphatases telles que la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase,  $\text{F}_1\text{F}_0$

ATPase ou la phosphatase alcaline, puisqu'elle est insensible à leurs inhibiteurs respectifs. Par contre elle est inhibée par l'azide de sodium, un inhibiteur spécifique des transporteurs ABC. Autre preuve de la stimulation de l'activité ATPase du récepteur des sulfonylurées par les ouvreurs, les mutations des résidus "catalytiques" du NBD2 réduisent significativement l'activation des canaux  $K_{ATP}$  par le rilmakalim.

Poussant plus loin ces investigations, il fut démontré, par des mesures de cinétiques de probabilité d'ouverture, que l'action des ouvreurs mime l'activation des canaux par l'ADP (*Figure 4* ; Bienengraeber et al., 2000), et que cette activation est inhibée par le système créatine-kinase/créatine-phosphate qui réduit la concentration d'ADP intracellulaire (*Figure 5* ; Bienengraeber et al., 2000).

Toutes ces données conduisent à l'hypothèse selon laquelle les ouvreurs agissent en stimulant l'hydrolyse de l'ATP, comme le feraient des substrats du récepteur des sulfonylurées. Les ouvreurs pourraient également stabiliser l'ADP, dont ils ont induit la production, dans les domaines de liaison des nucléotides activant ainsi les canaux  $K_{ATP}$ .

# ATPase activity of the sulfonylurea receptor: a catalytic function for the $K_{ATP}$ channel complex

MARTIN BIENENGRABER,\* ALEXEY E. ALEKSEEV,\* M. ROSELLE ABRAHAM,\* ANTONIO J. CARRASCO,\* CHRISTOPHE MOREAU,<sup>†</sup> MICHEL VIVAUDOU,<sup>†</sup> PETRAS P. DZEJA,\* AND ANDRE TERZIC\*<sup>1</sup>

\*Division of Cardiovascular Diseases, Departments of Medicine, Molecular Pharmacology and Experimental Therapeutics, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota 55905, USA; and <sup>†</sup>CEA, DBMS, Laboratoire de Biophysique Moléculaire et Cellulaire, 38054 Grenoble, France

**ABSTRACT** ATP-sensitive  $K^+$  ( $K_{ATP}$ ) channels are unique metabolic sensors formed by association of Kir6.2, an inwardly rectifying  $K^+$  channel, and the sulfonylurea receptor SUR, an ATP binding cassette protein. We identified an ATPase activity in immunoprecipitates of cardiac  $K_{ATP}$  channels and in purified fusion proteins containing nucleotide binding domains NBD1 and NBD2 of the cardiac SUR2A isoform. NBD2 hydrolyzed ATP with a twofold higher rate compared to NBD1. The ATPase required  $Mg^{2+}$  and was insensitive to ouabain, oligomycin, thapsigargin, or levamisole. K1348A and D1469N mutations in NBD2 reduced ATPase activity and produced channels with increased sensitivity to ATP.  $K_{ATP}$  channel openers, which bind to SUR, promoted ATPase activity in purified sarcolemma. At higher concentrations, openers reduced ATPase activity, possibly through stabilization of MgADP at the channel site. K1348A and D1469N mutations attenuated the effect of openers on  $K_{ATP}$  channel activity. Opener-induced channel activation was also inhibited by the creatine kinase/creatine phosphate system that removes ADP from the channel complex. Thus, the  $K_{ATP}$  channel complex functions not only as a  $K^+$  conductance, but also as an enzyme regulating nucleotide-dependent channel gating through an intrinsic ATPase activity of the SUR subunit. Modulation of the channel ATPase activity and/or scavenging the product of the ATPase reaction provide novel means to regulate cellular functions associated with  $K_{ATP}$  channel opening.—Bienengraeber, M., Alekseev, A. E., Abraham, M. R., Carrasco, A. J., Moreau, C., Vivaudou, M., Dzeja, P. P., Terzic, A. ATPase activity of the sulfonylurea receptor: a catalytic function for the  $K_{ATP}$  channel complex. *FASEB J.* 14, 1943–1952 (2000)

*Key Words:* ATP-sensitive  $K^+$  channels • enzyme • ABC proteins • nucleotide binding domains • potassium channel openers • Kir6.2 • SUR

CHANNEL FAMILIES ARE diversified through formation of heteromultimeric complexes, where distinct

subunits combine to form functional channels (1–4). In this way, ATP-sensitive  $K^+$  ( $K_{ATP}$ ) channels are formed by association of an inwardly rectifying  $K^+$  channel, Kir6.2, with the ATP binding cassette (ABC) protein, the sulfonylurea receptor SUR (5, 6). Originally discovered in the heart (7),  $K_{ATP}$  channels transduce cellular metabolic signals into membrane potential changes and regulate critical cellular functions, including cytoprotection (8–11). Although SUR confers metabolic sensing to the  $K_{ATP}$  channel complex by serving as a binding site for adenine nucleotides (12, 13), it is unknown whether intrinsic properties of this protein promote nucleotide exchange and thereby contribute to channel gating.

SUR, including the cardiac SUR2A isoform, possess two nucleotide binding domains, NBD1 and NBD2, located between the eleventh and twelfth transmembrane regions and at the carboxyl terminus of the protein (14, 15). A common feature of ABC proteins is that NBDs contain conserved Walker motifs that form nucleotide binding pockets (16–18). Mutations in these domains cause life-threatening diseases such as persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy or Tangier disease, a disorder of lipid metabolism (19–21). Mutations of key residues in SUR, which preclude nucleotide binding and/or hydrolysis in other ABC transporters (22, 23), alter the responsiveness of  $K_{ATP}$  channels to endogenous channel ligands, ATP and ADP (24, 25). These mutations also impede channel activation by  $K_{ATP}$  channel opening drugs (25–27). MgADP, interacting through NBDs, may stabilize an ‘activated’ state of SUR associated with a reduced sensitivity of the  $K_{ATP}$  channel complex to inhibition by ATP (18, 26, 28). Although it has been proposed that this SUR state could result from Mg ATP hydrolysis (18, 26, 28), such a catalytic function for NBDs in  $K_{ATP}$  channels has not been demonstrated.

We report that NBDs in SUR2A harbor an ATPase

<sup>1</sup> Correspondence: Guggenheim 7, Mayo Clinic, 200 First St. S.W., Rochester, MN 55905, USA. E-mail: terzic.andre@mayo.edu

activity that determines the sensitivity of  $K_{ATP}$  channels to ATP and is modulated by potassium channel openers. This intrinsic property, reduced by mutations in Walker motifs, contributes to  $K_{ATP}$  channel activation by favoring catalytic conversion of nucleotides at the channel site. Assigning a catalytic activity to the sulfonyleurea receptor subunit indicates that the cardiac  $K_{ATP}$  channel complex functions not only as a  $K^+$  conductance, but also as an enzyme regulating channel gating.

A preliminary account of this work has been published in abstract form (29).

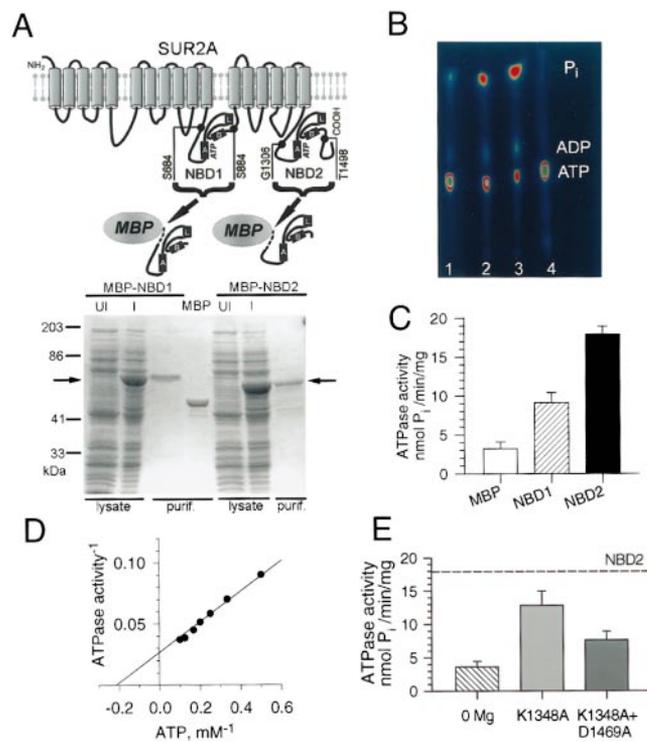
## MATERIALS AND METHODS

### ATPase activity in nucleotide binding domains

Nucleotide binding domains (Fig. 1A) NBD1 (Ser<sup>684</sup>-Ser<sup>884</sup>) and NBD2 (Gly<sup>1306</sup>-Thr<sup>1498</sup>) were amplified by polymerase chain reaction from rat SUR2A cDNA (15) and cloned in-frame with the maltose binding protein (MBP) coding sequence in pMal-c2 (New England Biolabs, Beverly, Mass.). The identity of fusion constructs was confirmed by DNA sequencing. NBDs were expressed in *Escherichia coli* TBI induced with 0.1 mM isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG) and fusion proteins were purified by affinity chromatography on an amylose resin in (in mM) 200 NaCl, 1 EDTA, 0.2 PMSF and 20 Tris (pH 7.4). Mutated NBDs (Lys<sup>1348</sup> to alanine and/or Asp<sup>1469</sup> to asparagine) were constructed in pMal-c2 by site-directed mutagenesis (QuickChange, Stratagene, San Diego, Calif.). ATPase activity of NBDs (10  $\mu$ g) was measured by monitoring production of [<sup>32</sup>P]P<sub>i</sub> from 1  $\mu$ Ci [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (30) in 34 mM KCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM HEPES (pH 7.4), and 4 mM ATP (4 h; 37°C). Using polyethylenimine cellulose thin-layer chromatography plates (Sigma, St. Louis, Mo.), nucleotides were resolved by ascending chromatography with 0.75 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and quantified with a PhosphorImager and ImageQuant software (Molecular Dynamics, Sunnyvale, Calif.). ATPase activity was confirmed by measuring ADP formation using high-performance liquid chromatography (HPLC) and a spectrophotometric coupled enzyme assay (31).

### ATPase activity in $K_{ATP}$ channel immunoprecipitates

$K_{ATP}$  channels were immunoprecipitated from guinea pig heart membranes with a Kir6.2 antibody (32). Cardiac membranes (400  $\mu$ g) were solubilized in an immunoprecipitation buffer (IP in mM: 50 Tris-HCl, 150 NaCl, 5 EDTA, 50 NaF; pH 8.3) and incubated with a Kir6.2 antibody (raised in rabbit against amino acids N19–32C of rat Kir6.2). The resulting antibody/ $K_{ATP}$  channel complex was precipitated with protein A Sepharose. After washes in IP buffer with 1% Nonidet P-40, 1 mM PMSF, 10 mg/ml leupeptin, and phosphate-buffered saline (PBS), samples were centrifuged and resuspended in PBS buffer. The amount of SUR2A protein was calculated assuming a density of 5  $K_{ATP}$  channels/ $\mu$ m<sup>2</sup> of cardiac membrane (33) and an immunoprecipitation efficiency of 10% (34). To measure ATPase activity, channel immunoprecipitates or corresponding controls were incubated with 2 mM ATP and 2 mM MgCl<sub>2</sub> for 20 h at 37°C while shaken at 170 rpm. The reaction was stopped by HClO<sub>4</sub> (2 mM), and kept on ice for 5 min. Proteins were precipitated by centrifugation at 15,000 *g* (4°C, 5 min). Supernates were neutralized with 2 M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; upon removal of potassium



**Figure 1.** ATPase activity in nucleotide binding domains of the  $K_{ATP}$  channel subunit SUR2A. A) NBD1 (Ser<sup>684</sup>-Ser<sup>884</sup>) and NBD2 (Gly<sup>1306</sup>-Thr<sup>1498</sup>) of SUR2A were subcloned into pMal-c2 plasmid in-frame with maltose binding protein (MBP). A and B: Walker A and B motifs, L: linker sequence. SDS/PAGE shows Coomassie blue-stained proteins from lysates of *E. coli* transformed with constructs containing MBP-NBD1 or MBP-NBD2. In contrast to uninduced cells (UI), induction by 1 mM IPTG (I) produced a prominent band corresponding to MBP-NBD1 (→) or MBP-NBD2 (←). Fusion proteins with NBD1 or NBD2 were purified (purif.) from lysates by affinity chromatography using an amylose resin. Purified MBP alone migrated at the expected size (43,000 kDa). B) ATPase activity in NBD1 and NBD2. The generation of [<sup>32</sup>P]P<sub>i</sub> from [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP was analyzed by thin-layer chromatography, followed by autoradiography with an image analyzer. Lane 1: MBP; lane 2: MBP-NBD1; lane 3: MBP-NBD2; lane 4: blank. C) Average ATPase activity for MBP, MBP-NBD1, and MBP-NBD2 (*n*=6–8 different preparations). D) Michaelis-Menten plot defining the ATPase activity of NBD2 (*V*<sub>max</sub> 35.4 nmol/min/mg and *K*<sub>m</sub> of 4.4 mM). E) ATPase activity of NBD2 is diminished by removal of Mg<sup>2+</sup> from the incubation medium. Neutralization of the lysine (K1348A) in the Walker A motif of the binding fold alone or in combination with additional mutation of aspartate (D1469A) in the Walker B motif decreased the NBD2 ATPase activity.

perchlorate precipitate, adenine nucleotides were determined by HPLC (31).

### ATPase activity in cardiac membranes

Purified cardiac membranes were isolated as described (35). Hearts from guinea pigs (0.2–0.3 kg), anesthetized with pentobarbital (75 mg/kg), were homogenized in hypotonic buffer (in mM: 10 HEPES, 1 EGTA, 1 DTT, 1 aprotinin, 0.2 phenylmethylsulfonyl fluoride, and 1  $\mu$ g/ml leupeptin; pH 7.4) and spun at 5000 *g* (4°C, 15 min). Supernatant was

centrifuged at 100,000  $g$  (4°C, 1 h) and membrane pellets were suspended by sonication in (in mM) 20 HEPES (pH 7.4), 140 NaCl, 5 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 0.5 dithiothreitol, 1 aprotinin, 0.2 phenylmethylsulfonyl fluoride, and 2  $\mu$ g/ml leupeptin. Sarcolemmal fraction was purified by sucrose density gradient centrifugation, and the degree of enrichment was determined based on Na, K-ATPase activity (36). Nascent ADP produced by ATPase activity was detected using a spectrophotometric coupled enzyme assay (31). Reaction medium contained (in mM) 50 Tris-HCl (pH 7.5), 50 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 2 dithiothreitol, 2 phosphoenolpyruvate, 0.15 NADH, 0.2 ouabain, 10 levamisole, 10 U/ml pyruvate kinase, 10 U/ml lactate dehydrogenase, and 10–20  $\mu$ g membrane protein. Release of inorganic phosphate (P<sub>i</sub>), the other product of ATPase activity, was measured by spectrophotometry using an EnzChek Phosphate Assay kit (Molecular Probes, Eugene, Oreg.). Incubation medium contained (in mM) 50 Tris-HCl (pH 7.5), 0.2 MESH substrate, 2 ATP, 2 MgCl<sub>2</sub>, 2 dithiothreitol, 0.2 ouabain, 10 levamisole, and 5 U/ml purine nucleoside phosphorylase.

### Recording of cardiac K<sub>ATP</sub> channels

Electrophysiological recordings were performed in ventricular myocytes dissociated from guinea pig hearts (37). Pipettes (~7–10 M $\Omega$ ) were filled with (in mM) KCl 140, CaCl<sub>2</sub> 1, MgCl<sub>2</sub> 1, HEPES-KOH 5 (pH 7.3). For the inside-out configuration, cells were superfused with ‘internal solution’ (in mM): KCl 140, MgCl<sub>2</sub> 1, EGTA 5, HEPES-KOH 5 (pH 7.3). For the open cell-attached patch, ‘internal solution’ was supplemented with glucose (1 g/l), malic acid (5 mM), and pyruvic acid (5 mM). After seal formation, the open cell-attached configuration was obtained by applying digitonin (8  $\mu$ g/ml) through a second pipette (filled with 5  $\mu$ g/ml propidium iodide and 0.5  $\mu$ g/ml rhodamine). Solution flow was visualized by rhodamine under ultraviolet light; staining the cell nucleus with propidium iodide served as a criterion for sarcolemmal permeabilization. For whole-cell recording, pipettes (~5 M $\Omega$ ) were filled with ‘internal solution’ plus 4 mM ATP, and cardiomyocytes superfused with Tyrode (in mM): NaCl 136.5, KCl 5.4, CaCl<sub>2</sub> 1.8, MgCl<sub>2</sub> 0.53, glucose 5.5, HEPES-NaOH 5.5 (pH 7.4). Whole-cell currents were obtained in response to 1 s rectangular pulses from a holding potential of –50 mV to 0 mV. Channel activity was expressed as NP<sub>o</sub>, where N represents the number of channels and P<sub>o</sub> the open channel probability. Concentration-dependent relationships were expressed in relative terms as NP<sub>o</sub> values measured in the presence *vs.* absence of a channel inhibitor and fitted with the Hill equation (37). Single-channel analysis was performed as described (37, 38).

### Recording of recombinant K<sub>ATP</sub> channels

Kir6.2 (5) and SUR2A (15), subcloned into a pGEMHE vector (25), were amplified and transcribed using the T7 mMessage mMachine kit (Ambion, Austin, Tex.). Mutagenesis of Lys<sup>1348</sup> to methionine or Asp<sup>1469</sup> to asparagine in SUR2A was done in the pGEMHE-SUR2A plasmid (QuickChange, Stratagene). cRNAs coding Kir6.2 (2 ng) and SUR2A (6 ng) were coinjected into defolliculated *Xenopus laevis* oocytes (25, 39). Recombinant K<sub>ATP</sub> channel currents were subsequently recorded in inside-out membrane patches (25, 39) using pipettes (2–10 M $\Omega$ ) containing (in mM) 154 K<sup>+</sup>, 146 Cl<sup>–</sup>, 5 Mg<sup>2+</sup>, and 10 PIPES-KOH (pH 7.1). The cytoplasmic face of the patch was bathed in (in mM) 174 K<sup>+</sup>, 40 Cl<sup>–</sup>, 1 Mg<sup>2+</sup>, 1 EGTA, 10 PIPES-KOH (pH 7.1), and methanesulfonate<sup>–</sup>. Membrane potential was maintained at –50 mV.

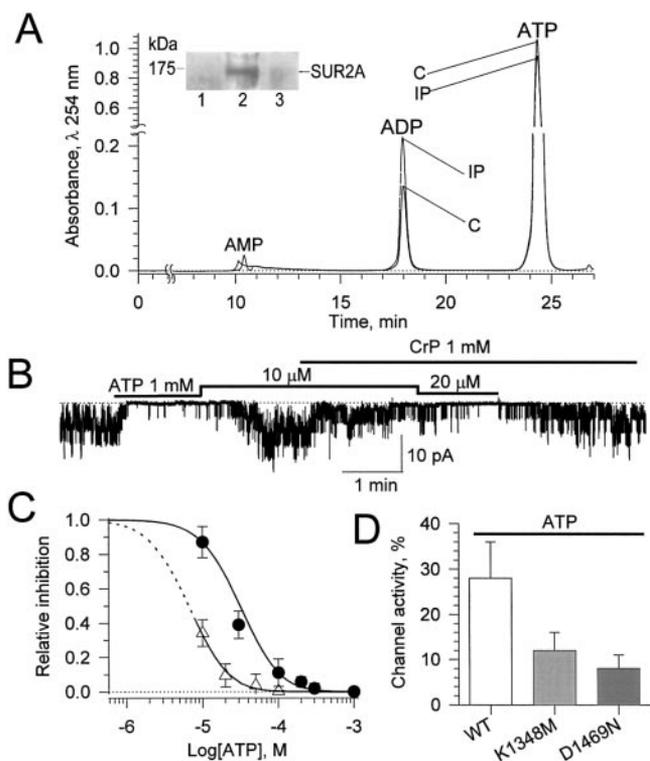
### Statistical analysis

Results are expressed as mean  $\pm$  SE;  $n$  refers to the number of samples from different preparations used in each analysis. Significant differences for unpaired samples were assessed by Student's  $t$  test. Difference at  $P < 0.05$  was considered significant.

## RESULTS

### ATPase activity in nucleotide binding domains of the sulfonylurea receptor

Nucleotide binding domains of the sulfonylurea receptor SUR bind ATP (18). NBD1 and NBD2 of the SUR2A isoform were engineered in-frame with the MBP to facilitate purification (Fig. 1A). *E. coli*, transformed with respective constructs and induced with IPTG, expressed a high yield of NBD1 and NBD2 fusion proteins detected at corresponding molecular weights on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS/PAGE; Fig. 1A). NBDs purified by affinity chromatography were exposed to  $\gamma$ -labeled [<sup>32</sup>P]ATP and ATPase activity was measured by monitoring generation of [<sup>32</sup>P]P<sub>i</sub> (Fig. 1B). The estimated ATPase activity was  $9.1 \pm 0.6$  and  $17.9 \pm 1.0$  nmol P<sub>i</sub>/min/mg for NBD1 ( $n=5$ ) and NBD2 ( $n=7$ ) fusion constructs, respectively (Fig. 1C). These values were significantly ( $P < 0.01$ ) different between each other and higher than  $3.2 \pm 0.9$  nmol P<sub>i</sub>/min/mg ( $n=7$ ) measured in samples containing MBP alone (Fig. 1C). The ATPase activity of NBD1 and NBD2 was further confirmed by following ADP formation using HPLC and spectrophotometry (not illustrated). Either approach consistently demonstrated a significantly higher ATPase activity in NBD2 compared to NBD1 fusion proteins. The ATPase activity in NBD-containing samples was insensitive to inhibitors of conventional ATPases and phosphatases, ouabain (1 mM), oligomycin (10  $\mu$ g/ml), thapsigargin (0.1 mg/ml), and/or levamisole (10 mM). The ATPase activity of NBDs was dependent on ATP concentration (Fig. 1D). For the most active NBD2, the Michaelis-Menten plot exhibited a  $V_{max}$  of 35.4 nmol/min/mg and an apparent  $K_m$  of 4.4 mM (Fig. 1D). Removal of Mg<sup>2+</sup>, a cofactor in the ATPase reaction, reduced the ATPase activity (Fig. 1E). Site-directed mutagenesis of the lysine residue (K1348A), in the signature Walker A motif of NBD2, reduced ATPase activity (Fig. 1E). This catalytic activity was further diminished in the double NBD2 mutant in which the Walker A lysine<sup>1348</sup> moiety was mutated in combination with the Walker B aspartate<sup>1469</sup> (K1348A+D1469N). Thus, nucleotide binding domains in the sulfonylurea receptor, primarily NBD2, possess intrinsic ATPase activity.



**Figure 2.** ATPase activity of the  $K_{ATP}$  channel complex. *A*) HPLC chromatogram showing increased ADP generation from ATP in cardiac sarcolemmal Kir6.2-immunoprecipitates (IP) compared to preimmune control serum (C). Inset: Immunoblot of cardiac sarcolemma probed with a monoclonal SUR2A antibody in the absence (lane 1) or after immunoprecipitation by a Kir6.2 antibody (lane 2). In the control lane 3, the secondary rabbit-IgG-HRP antibody cannot recognize a protein in Kir6.2 immunoprecipitates in the absence of the primary SUR2A antibody. *B*) Activation of the creatine kinase-catalyzed, ADP-removing system by creatine phosphate (CrP) increases the sensitivity of native cardiac  $K_{ATP}$  channels. Current record was obtained in open cell-attached patches at a holding potential of  $-60$  mV. *C*) Concentration-response curve for ATP-induced inhibition of cardiac  $K_{ATP}$  channels in inside-out patches in the absence of the CrP/creatine kinase system (filled circles) and in open cell-attached patches with 1 mM CrP (open circles). *D*) Sensitivity of recombinant wild-type and mutant cardiac  $K_{ATP}$  channels toward ATP (100  $\mu$ M). Wild-type Kir6.2/SUR2A ( $n=8$ ) was inhibited by 70% relative to channel activity in the absence of ATP, whereas Kir6.2 coexpressed with mutant K1348M ( $n=6$ ) or D1469N ( $n=6$ ) SUR2A was inhibited by roughly 90% of control activity. Currents in each condition were obtained in inside-out patches after expression in oocytes.

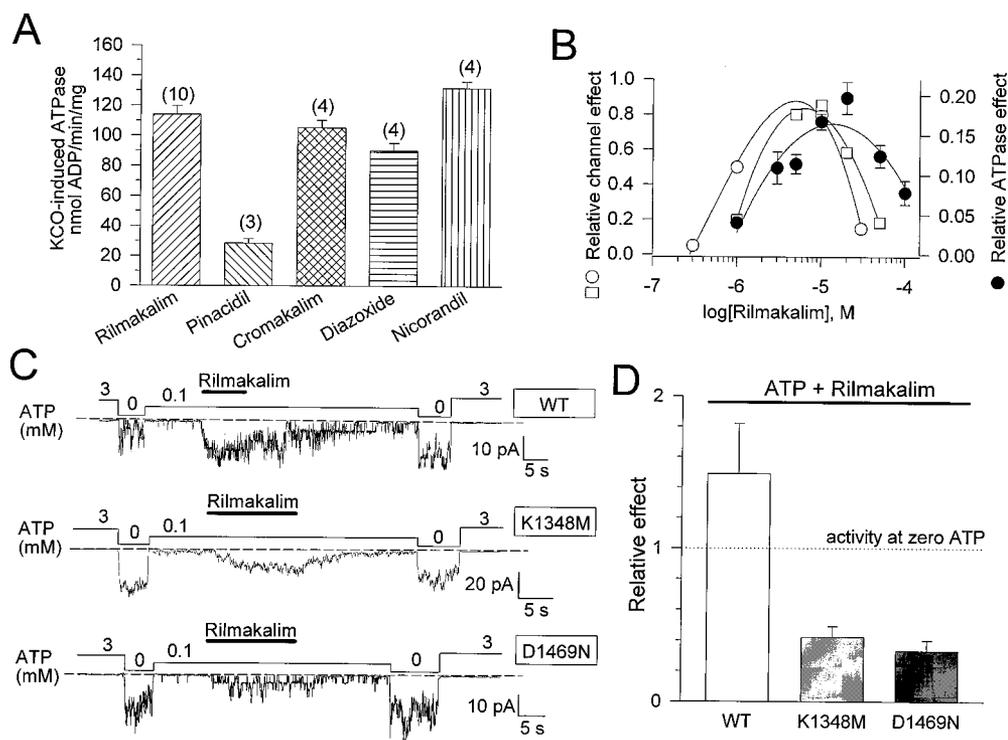
### ATPase activity of the $K_{ATP}$ channel complex regulates channel sensitivity to ATP

SUR2A associates with Kir6.2 to form cardiac  $K_{ATP}$  channels (15, 32). Accordingly, a Kir6.2 antibody (11) coimmunoprecipitates both Kir6.2 and SUR2A subunits from cardiac sarcolemma (Fig. 2A, inset). In immunoprecipitates of  $K_{ATP}$  channel proteins, ATPase activity was assayed by HPLC (Fig. 2A). Consistent with enzymatic activity of  $K_{ATP}$  channels, immunoprecipitates of the channel complex con-

verted ATP into ADP, with an ATPase activity estimated at  $31 \pm 8$  nmol ADP/min/mg ( $n=7$ ). Such ATPase activity could catalyze local hydrolysis of ATP, and thereby promote  $K_{ATP}$  channel opening. Indeed, 10  $\mu$ M ATP failed to inhibit native cardiac  $K_{ATP}$  channels (40) under conditions of unimpeded ATPase activity (Fig. 2B). However, when the product of the ATPase reaction, ADP, was continuously removed through creatine phosphate (CrP)-activated creatine kinase (41), 10  $\mu$ M ATP suppressed  $K_{ATP}$  channel opening (Fig. 2B). In fact, in the presence of CrP, the  $IC_{50}$  for channel inhibition was reduced by over threefold, from  $25.1 \pm 1.4$   $\mu$ M ( $n=9$ ) to  $7.4 \pm 0.4$   $\mu$ M ( $n=4$ ; Fig. 2C). Moreover, mutations of the Walker A lysine<sup>1348</sup> and Walker B aspartate<sup>1469</sup>, which reduce ATPase activity of NBD2 (Fig. 1E), produced recombinant  $K_{ATP}$  channels with a higher sensitivity to ATP (100  $\mu$ M) compared to wild-type Kir6.2/SUR2A (Fig. 2D). Thus, the ATPase activity of  $K_{ATP}$  channels regulates the channel responsiveness to ATP.

### Potassium channel opener-induced ATPase activity

Potassium channel openers bind to SUR and promote  $K_{ATP}$  channel opening by reducing channel sensitivity to ATP (39, 42–45). In cardiac sarcolemma, the structurally distinct potassium channel openers rilmakalim (10  $\mu$ M), pinacidil (50  $\mu$ M), cromakalim (100  $\mu$ M), diazoxide (100  $\mu$ M), and nicorandil (100  $\mu$ M) promoted hydrolysis of ATP into ADP, indicating activation of ATPase activity (Fig. 3A). Depending on the potassium channel opener tested, opener-induced ATPase activity ranged from 28 to 132 nmol  $\cdot$  min<sup>-1</sup>  $\cdot$  mg protein<sup>-1</sup> above the basal membrane ADP-generating capacity (Fig. 3A). Opener-induced ADP generation was associated with increased liberation of inorganic phosphate, the other product in the ATPase reaction. In the presence of a representative potassium channel opener, rilmakalim (10  $\mu$ M), the ATPase activity calculated by increased inorganic phosphate ( $P_i$ ) generation was  $139 \pm 8$  nmol  $P_i$   $\cdot$  min<sup>-1</sup>  $\cdot$  mg protein<sup>-1</sup> ( $n=6$ ), a value similar to that obtained from ADP-generation measurements ( $114 \pm 6$  nmol ADP  $\cdot$  min<sup>-1</sup>  $\cdot$  mg protein<sup>-1</sup>;  $n=10$ ). Opener-induced increase in ATPase activity required  $Mg^{2+}$ . However, it was not inhibited by ouabain (200  $\mu$ M), oligomycin (1  $\mu$ g/ml), and/or levamisole (10 mM). Corresponding rilmakalim-induced ATPase activities were  $139 \pm 10$ ,  $119 \pm 8$ , and  $118 \pm 9$  nmol  $\cdot$  min<sup>-1</sup>  $\cdot$  mg protein<sup>-1</sup> with ouabain ( $n=4$ ), oligomycin ( $n=4$ ) and levamisole ( $n=4$ ) alone, and  $111 \pm 6$  nmol  $\cdot$  min<sup>-1</sup>  $\cdot$  mg protein<sup>-1</sup> ( $n=4$ ) in the presence of a mixture containing all three conventional ATPase and phosphatase inhibitors. This suggests that the effect of openers on ADP and  $P_i$  generation is not due to activation of sarcolemmal Na,K-ATPase, mitochondrial  $F_1F_0$ -ATPase, or alkaline



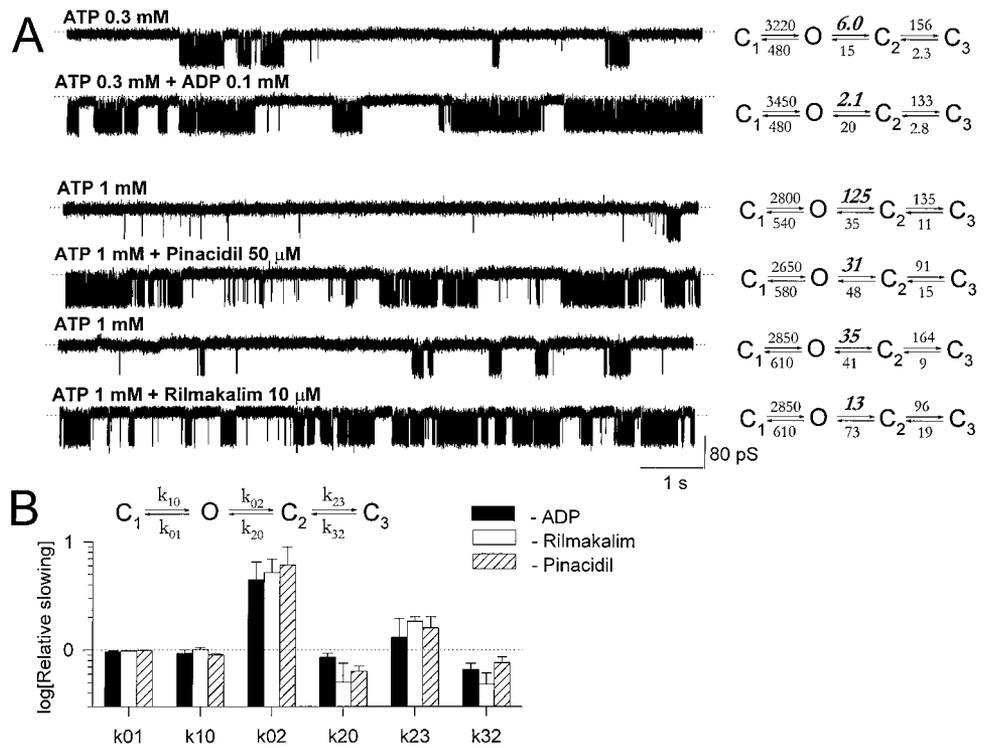
**Figure 3.** Potassium channel openers modulate ATPase activity. *A*) Potassium channel opener (KCO)-activated ATPase activity in cardiac sarcolemma. Rilmakalim (10  $\mu\text{M}$ ), pinacidil (50  $\mu\text{M}$ ), cromakalim (100  $\mu\text{M}$ ), diazoxide (100  $\mu\text{M}$ ) and nicorandil (100  $\mu\text{M}$ ) increased ATPase activity measured as ADP generation using a spectrophotometric method. Basal sarcolemmal ATPase activity was  $646 \pm 9 \text{ nmol ADP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$  ( $n=10$ ). Number of experiments for each opener is shown in parentheses. *B*) Bell-shaped concentration-dependent relationship of rilmakalim-induced  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channel opening correlates with the concentration-dependent relationship of rilmakalim-mediated activation of ATP hydrolysis. Opener-induced channel activity was measured in whole-cell (open squares) and inside-out (open circles) patches, and expressed relative to the left scale. Opener-induced ATPase activity (filled circles) was estimated by ADP generation and expressed relative to the right scale. *C*) Reduced effect of rilmakalim on recombinant cardiac  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channels with mutations suppressing ATPase activity. Current traces obtained from oocytes coexpressing Kir6.2 with wild-type SUR2A (WT) or SUR2A mutants K1348M or D1469N. *D*) Average values of patch current measured in the presence of ATP (100  $\mu\text{M}$ ) before and after application of rilmakalim (10  $\mu\text{M}$ ) for wild-type ( $n=8$ ), K1348M ( $n=6$ ), and D1469N ( $n=6$ ) SUR2A. Currents in each condition were obtained in inside-out patches, and normalized to the current in the absence of ATP obtained by linear extrapolation of values measured before and after opener application.

phosphatase. In contrast, 10  $\mu\text{M}$  rilmakalim failed to promote ATPase activity in the presence of 10 mM azide, an inhibitor of ATPase activity in purified ABC proteins (46). The effect of openers on cardiac membrane ATPase activity was concentration dependent; with rilmakalim, maximal activation was observed between 10 and 20  $\mu\text{M}$  (Fig. 3*B*). Beyond this concentration the opener was less effective (Fig. 3*B*), and at 200 to 500  $\mu\text{M}$  could inhibit membrane ATPase activity by 15 to 35%. Within the concentration range from 0.1 to 100  $\mu\text{M}$ , the bell-shaped dependence of rilmakalim-induced ATPase activity closely correlated with the concentration dependence of  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channel activation (Fig. 3*B*). Mutations in SUR2A that suppressed ATPase activity (Fig. 1*E*) also reduced the ability of rilmakalim (10  $\mu\text{M}$ ) to activate  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channels inhibited by ATP (Fig. 3*C, D*). Rilmakalim vigorously activated wild-type Kir6.2/SUR2A, and was four- to fivefold less effective after mutations in Walker A lysine<sup>1348</sup> and Walker B aspartate<sup>1469</sup>, respectively (Fig. 3*C, D*). Thus, potassium channel openers modulate ATPase activity and muta-

tions that reduce such catalytic activity reduce opener-mediated channel activation.

### Openers mimic ADP-induced $\text{K}_{\text{ATP}}$ channel behavior

At the single-channel level, the product of the ATPase reaction, ADP, induces a readily recognizable pattern of  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channel transitions between open and closed conformations (37). ADP (0.1 mM) had no effect on intraburst transitions ( $C_1 \leftrightarrow O$ ; rates  $k_{01}$  and  $k_{10}$ ), but slowed burst closure (rate  $k_{02}$ ) and diminished lifetime in long-lasting ( $C_2 \leftrightarrow C_3$ ) closed states (accelerated rates  $k_{20}$  and  $k_{32}$ , and reduced rate  $k_{23}$ ; Fig. 4*A, B*). This pattern was associated with burst prolongation (from 1.3 s in the absence to 3.9 s in the presence of ADP) and shortened interburst events leading to increased open channel probability (from 0.22 to 0.62; Fig. 4*A*). Similarly to MgADP, rilmakalim (10  $\mu\text{M}$ ) and pinacidil (50  $\mu\text{M}$ ) also did not affect intraburst transitions (rates  $k_{01}$  and  $k_{10}$ ;



**Figure 4.** ADP and potassium channel openers produced similar changes in  $K_{ATP}$  channel kinetics. *A*) Representative  $K_{ATP}$  channel records measured at +60 mV holding pipette potential. Four states kinetic schemes, with calculated rates of transition, are presented on the right of each corresponding channel record. *B*) ADP and potassium channel openers (rilmakalim and pinacidil) produced similar changes in transition rates defining  $K_{ATP}$  channel kinetic behavior. Changes in rates produced by ADP and openers are presented as a relative slowing with regard to values obtained in the presence of ATP alone ( $n=3$  for each experimental condition).

Fig. 4A, B). Like ADP, both openers slowed  $k_{02}$  and  $k_{23}$  while accelerating  $k_{20}$  and  $k_{32}$  (Fig. 4A, B). This prolonged burst duration (from 0.17 to 0.46 s for rilmakalim and from 0.05 to 0.17 s for pinacidil) shortened interburst events and increased open channel probability (from 0.28 to 0.84 and from 0.11 to 0.54, respectively). Thus, openers and MgADP induce the same profile of  $K_{ATP}$  channel conformational transitions associated with channel activation.

### Creatine kinase regulates opener-induced $K_{ATP}$ channel opening

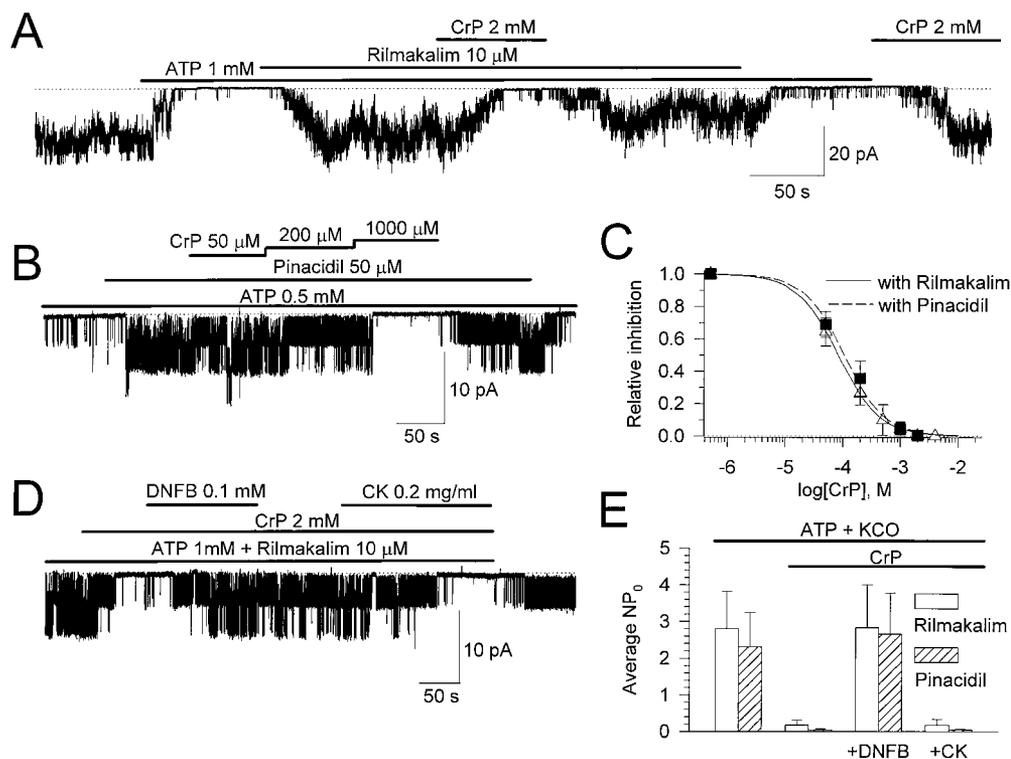
Creatine kinase, which catalyzes ADP phosphorylation in the  $MgADP + CrP \leftrightarrow creatine + MgATP$  reaction, provides the major phosphotransfer pathway in the heart (31). After sarcolemmal permeabilization, which results in loss of cellular CrP and creatine kinase-dependent ADP utilization, millimolar concentrations of ATP were required to inhibit  $K_{ATP}$  channels (Fig. 5A). Under such conditions, rilmakalim (10  $\mu$ M; Fig. 5A) and pinacidil (50  $\mu$ M) readily reversed ATP-inhibited channel activity. On average,  $K_{ATP}$  channel activity in the presence of openers ( $NP_0 = 4.9 \pm 0.6$ ;  $n=35$  and  $4.5 \pm 0.9$ ;  $n=15$ , respectively) was similar to that obtained in the absence of ATP ( $4.9 \pm 0.4$ ;  $n=53$ ). In fact, more than 10 mM ATP was required to abolish rilmakalim (10  $\mu$ M) or pinacidil (50  $\mu$ M) -induced channel opening. However, the effect of openers was abolished by supplying CrP (Fig. 5A, B). CrP antagonized the effect of distinct openers with the same potency (Fig. 5C), suggesting a common mechanism, such as ADP

removal, as responsible for inhibition of rilmakalim- and pinacidil-induced channel activity. This effect of CrP was abolished by 0.1 mM 2-4-dinitrofluorobenzene (DNFB), an irreversible creatine kinase inhibitor (Fig. 5D, E). Application of exogenous creatine kinase (0.2 mg/ml) restored the ability of CrP to suppress opener-induced  $K_{ATP}$  channel activity (Fig. 5D, E). Thus, the efficacy of potassium channel openers to activate  $K_{ATP}$  channels is determined by the availability of a reaction system capable of scavenging ADP, the product of the ATPase reaction.

### DISCUSSION

This study provides direct evidence that the cardiac  $K_{ATP}$  channel harbors an ATPase activity sensitive to potassium channel openers. This catalytic activity was identified in NBD2 and, to a lesser extent, in NBD1 domains of the SUR2A subunit. Mutations in NBD2 that reduced the ATPase activity increased the sensitivity of  $K_{ATP}$  channels to ATP and attenuated the ability of openers to activate  $K_{ATP}$  channels. This intrinsic enzymatic activity may thus contribute to the nucleotide- and opener-dependent gating of  $K_{ATP}$  channels.

In some ABC proteins, NBDs are known to contain ATPase activity critical for protein function (47–50). The ATPase intrinsic to ABC transporters has been proposed to serve as a switch between ATP- and ADP-liganded conformations and the energy of ATP hydrolysis implicated in supporting transport function and ion conductance (17, 51). The SUR subunit



**Figure 5.** Creatine phosphate/creatine kinase inhibits opener-induced  $K_{ATP}$  channel activity. *A*) Opener-activated, ATP-inhibited  $K_{ATP}$  channels in a cardiomyocyte. Calculated (not shown) concentration dependence for ATP-induced channel inhibition ( $K_i=0.27 \pm 0.02$  mM;  $h=2.1 \pm 0.27$ ) was significantly shifted to the right by 10  $\mu$ M rilmakalim ( $K_d=5.7 \pm 0.5$  mM;  $h=2.4 \pm 0.5$ ) or 50  $\mu$ M pinacidil ( $K_i=2.4 \pm 0.1$  mM;  $h=2.3 \pm 0.2$ ). Creatine phosphate (CrP) inhibited the effect of opener. Alone, CrP did not significantly inhibit  $K_{ATP}$  channel activity. *B*) CrP inhibited opener-induced  $K_{ATP}$  channel activity in a concentration-dependent manner. *C*) The concentration-dependent relationship defining the CrP effect was indistinguishable in the presence of rilmakalim (open triangles, solid curve) or pinacidil (filled squares, dashed curve). Curves were constructed using a fit of experimental data ( $n=3$  for each opener) by the Hill equation and characterized by a  $K_i=83 \pm 2$   $\mu$ M ( $h=1.2 \pm 0.1$ ) with rilmakalim (10  $\mu$ M) and 107  $\pm 9$   $\mu$ M ( $h=1.1 \pm 0.1$ ) with pinacidil (50  $\mu$ M). *D*) DNFB, a potent inhibitor of creatine kinase, antagonized CrP inhibition of opener-induced  $K_{ATP}$  channel activity. Application of purified creatine kinase (CK) reversed the effect of DNFB. *E*) Average  $NP_o$  values obtained in the presence of ATP (1 mM) plus a potassium channel opener (10  $\mu$ M rilmakalim or 50  $\mu$ M pinacidil) as indicated under control conditions in the presence of creatine phosphate (CrP, 2 mM), CrP plus DNFB (0.1 mM), and CrP plus purified creatine kinase (0.2 mg/ml). Data were averaged from five experiments under each condition.  $K_{ATP}$  channel activity was measured in cardiomyocytes, using the open cell-attached patch configuration, at a holding pipette potential of  $-60$  mV.

of the  $K_{ATP}$  channel has been recognized for its role in channel trafficking and biogenesis (52, 53), as a receptor for pharmacological modulators (39, 43, 44), and as a site for nucleotide binding (12, 13, 18, 28, 54). The present demonstration of ATPase activity in NBDs identifies a new property for SUR, supporting previous suggestions that such catalytic activity could serve as an underlying mechanism for the nucleotide regulation of  $K_{ATP}$  channels (18, 26, 28, 55).

The  $V_{max}$  and  $K_m$  for the ATPase in NBDs of SUR2A were within the range of values reported for ATPase activity of other ABC proteins (47, 56). As in other ABC transporters (57), the  $K_{ATP}$  channel ATPase activity was insensitive to inhibitors of F- or P-ATPase types, indicating that the SUR ATPase is distinct from conventional ATPases. Nevertheless, it required  $Mg^{2+}$ , confirming the catalytic nature of ATP hydrolysis. Although mutations in conserved Walker motifs did not completely abolish ATPase

activity, the rate of ATP hydrolysis was significantly decreased, particularly for the double mutant K1348A+D1469N where amino acids in both Walker A and B were neutralized. Equivalent site-directed mutagenesis in Walker motifs of other ABC transporters also reduce their respective ATPase activities (47, 58, 59).

Suppression of ATPase activity by mutations in Walker motifs of SUR2A increased the sensitivity of cardiac  $K_{ATP}$  channels to ATP, as in the mutated SUR1 isoform (24). Furthermore, neutralizing the product of ATP hydrolysis, by the CrP/creatine kinase phosphotransfer system, revealed a threefold higher  $K_{ATP}$  channel sensitivity to ATP (60). Thus, the intrinsic ATPase activity of  $K_{ATP}$  channels sets the apparent ATP-sensitivity of the channel to a level lower than that expected in the absence of ATP hydrolysis.

Potassium channel openers, which specifically bind to SUR (39, 43, 44), promoted ATPase activity.

The concentration dependence of opener-induced ATPase activity closely correlated with opener-induced  $K_{ATP}$  channel activation. At higher concentrations, potassium channel openers inhibited ATPase activity while still producing  $K_{ATP}$  channel activation (61). This apparent contradiction can be related to an opener-induced stabilization of MgADP in the active ATPase site after ATP hydrolysis (29). ADP trapping at the ATPase active site observed with conventional ATPase inhibitors (48) would keep the channel predominantly in the ADP-bound state, thereby promoting channel opening. As openers mimicked MgADP-induced  $K_{ATP}$  channel kinetic behavior, this would support the proposed concept that activation of  $K_{ATP}$  channels may be associated with ADP production and/or stabilization of the ADP-bound state at the SUR subunit (26, 28, 55).

Mutations of conserved lysine to methionine (K1348M) and aspartate to asparagine (D1469N) residues in Walker A and B motifs of NBD2, which abolish channel activation by ADP (25), reduced rilmakalim-induced channel opening. This may be associated with partial inhibition of ATPase activity observed with such mutations or with the possibility that openers could act through an alternative pathway, including an ADP-independent mechanism. This is supported by the observation that analogous mutations in the SUR1 isoform abolished the effect of ADP, but only reduced the action of openers or metabolic stress on channel activity (27).

Potassium channel opener-induced  $K_{ATP}$  channel opening was inhibited by the CrP/creatine kinase system, which removes ADP from the channel site. Under this condition, due to relief of end-product inhibition, the ATPase reaction should proceed at an even higher rate (41, 62). Thus, the product of ATPase catalysis, ADP, rather than ATP hydrolysis *per se*, appears to be essential for channel activation. By scavenging the ATPase product, creatine kinase would provide an efficient means of regulating  $K_{ATP}$  channel behavior (41, 60, 63). In the heart, creatine kinase is the major phosphotransfer system whose flux is dramatically reduced under metabolic stress (31, 62). Here, inhibition of creatine kinase promoted  $K_{ATP}$  channel activation by openers. The reported higher responsiveness of ischemic hearts to openers (64) could be the consequence of reduced creatine kinase flux early in ischemia, which would facilitate activation of  $K_{ATP}$  channels and associated cardioprotective processes (65). Thus, the balance between ATP hydrolysis, through the opener-sensitive channel ATPase, and ADP removal, through the creatine kinase system, provides an integral mechanism of  $K_{ATP}$  channel regulation under different cellular metabolic states.

It should be noted that removal of ADP by creatine kinase is associated with ATP generation, which, if

sufficient, could inhibit opener-induced channel activation. Inhibition of opener-induced  $K_{ATP}$  channel activity would require  $\sim 10$  mM of ATP. Under our experimental conditions, such elevation of ATP is unlikely since the source for ATP regeneration is ADP resulting from intracellular ATP hydrolysis, and therefore the overall concentration of synthesized ATP, cannot far exceed 1 mM of ATP applied in the bath solution. Although activation of an ATP-regenerating system, which removes ADP, may reduce opener binding to the cardiac SUR2A isoform (66), this has not been observed at concentrations of nucleotides used in our experiments. Thus, loss of opener-induced channel activation in the presence of an ADP-scavenging system is apparently not due to an increase in the local ATP concentration or reduction of opener binding.

In summary, this study demonstrates that the cardiac  $K_{ATP}$  channel complex possesses an ATPase activity found in NBDs of the SUR2A subunit. Such intrinsic enzymatic activity defines  $K_{ATP}$  channels not only as passive targets responding to alterations in the cellular metabolic status, but also as active contributors to their nucleotide-dependent gating. Therefore, modulation of the channel ATPase activity and/or of metabolic systems that scavenge the product of the ATPase reaction provides a novel means of regulating vital cellular functions associated with  $K_{ATP}$  channel opening. **[F]**

We are grateful to Dr. S. Seino (Chiba, Japan) for Kir6.2, SUR2A cDNA, and the SUR2A antibody, as well as to Dr. M. Puceat (Montpellier, France) for the Kir6.2 antibody. Supported by the National Institutes of Health (HL64822, HL07111, and GM19567), the American Heart Association, the Guidant Foundation, Miami Heart Research Institute, Bruce and Ruth Rappaport Program in Vascular Biology and Gene Delivery at the Mayo Foundation, and by grants from the Association Francaise contre les Myopathies, Association Francaise de Lutte contre la Mucoviscidose, Commissariat à l'Énergie Atomique, and Centre Nationale de la Recherche Scientifique.

## REFERENCES

1. Hille, B., Armstrong, C. M., and McKinnon, R. (1999) Ion channels: From idea to reality. *Nat. Med.* **5**, 1105–1109
2. Miller, C. (1992) Ion channel structure and function. *Science* **258**, 240–241
3. Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (1997) Cloned potassium channels from eukaryotes to prokaryotes. *Annu. Rev. Neurosci.* **20**, 91–123
4. Krapivinsky, G., Gordon, E. A., Wickman, K., Velimirovic, B., Krapivinsky, L., and Clapham, D. E. (1995) The G-protein-gated atrial  $K^+$  channel  $I_{KACH}$  is a heteromultimer of two inwardly rectifying  $K^+$ -channel proteins. *Nature (London)* **374**, 135–141
5. Inagaki, N., Gono, T., Clement, J. P., Namba, N., Inazawa, J., Gonzalez, G., Aguilar-Bryan, L., Seino, S., and Bryan, J. (1995) Reconstitution of  $I_{KATP}$ : an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* **270**, 1166–1170
6. Lorenz, E., Alekseev, A. E., Krapivinsky, G. P., Carrasco, A. J., Clapham, D. E., and Terzic, A. (1998) Evidence for direct physical interaction between a  $K_{ATP}$  channel (Kir6.2) and an ATP-binding cassette protein (SUR1) which affects cellular

- distribution and kinetic behavior of an ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 1652–1659
7. Noma, A. (1983) ATP-regulated K<sup>+</sup> channels in cardiac muscle. *Nature (London)* **305**, 147–148
  8. Jovanovic, A., Jovanovic, S., Lorenz, E., and Terzic, A. (1998) Recombinant cardiac ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel subunits confer resistance to chemical hypoxia-reoxygenation injury. *Circulation* **98**, 1548–1555
  9. Jovanovic, A., Jovanovic, S., Carrasco, A. J., and Terzic, A. (1998) Acquired resistance of a mammalian cell line to hypoxia-reoxygenation through co-transfection of Kir6.2 and SUR1 clones. *Lab. Invest.* **78**, 1101–1107
  10. Jovanovic, N., Jovanovic, A., Jovanovic, S., and Terzic, A. (1999) Gene delivery of Kir6.2/SUR2A in conjunction with pinacidil handles intracellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis under metabolic stress. *FASEB J.* **13**, 923–929
  11. Terzic, A. (1999) New frontiers of cardioprotection. *Clin. Pharmacol. Ther.* **66**, 105–109
  12. Seino, S. (1999) ATP-sensitive potassium channels: a model of heteromultimeric potassium channel/receptor assemblies. *Annu. Rev. Physiol.* **61**, 337–362
  13. Bryan, J., and Aguilar-Bryan, L. (1999) Sulfonylurea receptors: ABC transporters that regulate ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Biochim. Biophys. Acta* **1461**, 285–303
  14. Aguilar-Bryan, L., Nichols, C., Wechsler, S., Clement, J., Boyd, A., Gonzalez, G., Herrerasosa, H., Nguy, K., Bryan, J., and Nelson, D. (1995) Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* **268**, 423–426
  15. Inagaki, N., Gono, T., Clement, J. P., Wang, C. Z., Aguilar-Bryan, L., Seino, S., and Bryan, J. (1996) A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Neuron* **16**, 1011–1017
  16. Higgins, C. F. (1992) ABC-transporters: from microorganism to man. *Annu. Rev. Cell Biol.* **8**, 67–113
  17. Senior, A. E., and Gadsby, D. C. (1997) ATP hydrolysis cycles and mechanism in P-glycoprotein and CFTR. *Semin. Cancer Biol.* **8**, 143–150
  18. Matsuo, M., Kioka, N., Amachi, T., and Ueda, K. (1999) ATP binding properties of the nucleotide-binding folds of SUR1. *J. Biol. Chem.* **274**, 37479–37482
  19. Nichols, C. G., Shyng, S., Nestorowicz, A., Glaser, B., Clement, J., Gonzalez, G., Aguilar-Bryan, L., Permutt, M., and Bryan, J. (1996) Adenosine diphosphate as an intracellular regulator of insulin secretion. *Science* **272**, 1785–1787
  20. Bodzioch, M., Orsó, E., Klucken, J., Langmann, T., Bottcher, A., Diederich, W., Drobnik, W., Barlage, S., Buchler, C., Porsch-Ozcurumez, M., Kaminski, W. E., Hahmann, H. W., Oette, K., Rothe, G., Aslanidis, C., Lackner, K. J., and Schmitz, G. (1999) The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat. Genet.* **22**, 347–351
  21. Abraham, M. R., Jahangir, A., Alekseev, A. E., and Terzic, A. (1999) Channelopathies of inwardly rectifying potassium channels. *FASEB J.* **13**, 1901–1910
  22. Shyamala, V., Baichwal, V., Beall, E., and Ames, G.F.-L. (1991) Structure-function analysis of the histidine permease and comparison with cystic fibrosis mutations. *J. Biol. Chem.* **266**, 18714–18719
  23. Loo, T. W., and Clarke, D. M. (1995) Rapid purification of human P-glycoprotein mutants expressed transiently in HEK 293 cells by nickel-chelate chromatography and characterization of their drug-stimulated ATPase activities. *J. Biol. Chem.* **270**, 21449–21452
  24. Gribble, F. M., Tucker, S. J., Haug, T., and Ashcroft, F. M. (1998) MgATP activates the β cell K<sub>ATP</sub> channel by interaction with its SUR1 subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 7185–7190
  25. D'hahan, N., Moreau, C., Prost, A. L., Jacquet, H., Alekseev, A. E., Terzic, A., and Vivaudou, M. (1999) Pharmacological plasticity of cardiac ATP-sensitive potassium channels toward diazoxide revealed by ADP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **12**, 12162–12167
  26. Shyng, S.-L., Ferrigni, T., and Nichols, C. G. (1997) Regulation of K<sub>ATP</sub> channel activity by diazoxide and MgADP. *J. Gen. Physiol.* **110**, 643–654
  27. Gribble, F. M., Tucker, S. J., and Ashcroft, F. M. (1997) The essential role of the Walker A motifs of SUR1 in K<sub>ATP</sub> channel activation by MgADP and diazoxide. *EMBO J.* **16**, 1145–1152
  28. Ashcroft, F. M., and Gribble, F. M. (1998) Correlating structure and function in ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Trends Neurosci.* **21**, 288–294
  29. Dzeja, P. P., Carrasco, A. J., Abraham, M. R., Alekseev, A. E., and Terzic, A. (1999) A K<sub>ATP</sub> channel ATPase activity modulated by potassium channel openers. *Physiologist* **42**, A-3 (abstr.)
  30. Hiromura, M., Yano, M., Mori, H., Masahiro, I., and Hiroshi, K. (1997) Intrinsic ADP-ATP exchange activity is a novel function of the molecular chaperone, Hsp70. *J. Biol. Chem.* **273**, 5435–5438
  31. Dzeja, P. P., Vitkevicius, K. T., Redfield, M. M., Burnett, J. C., and Terzic, A. (1999) Adenylate kinase-catalyzed phosphotransfer in the myocardium: Increased contribution in heart failure. *Circ. Res.* **84**, 1137–1143
  32. Lorenz, E., and Terzic, A. (1999) Physical association between recombinant cardiac ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel subunits Kir6.2 and SUR2A. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **31**, 425–434
  33. Terzic, A., Tung, R. T., and Kurachi, Y. (1994) Nucleotide regulation of ATP sensitive potassium channels. *Cardiovasc. Res.* **28**, 746–753
  34. Snabes, M., Boyd, A. E., Purdue, R., and Bryan, J. (1981) A DNase I binding/immunoprecipitation assay for actin. *J. Biol. Chem.* **256**, 6291–6295
  35. Loffler-Walz, C., and Quast, U. (1998) Binding of K<sub>ATP</sub> channel modulators in rat cardiac membranes. *Br. J. Pharmacol.* **123**, 1395–1402
  36. Elvir-Mairena, J. R., Jovanovic, A., Gomez, L. A., Alekseev, A. E., and Terzic, A. (1996) Reversal of the ATP-liganded state of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels by adenylate kinase activity. *J. Biol. Chem.* **271**, 31903–31908
  37. Alekseev, A. E., Brady, P. A., and Terzic, A. (1998) Ligand-insensitive state of cardiac ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels—basis for channel opening. *J. Gen. Physiol.* **111**, 381–394
  38. Alekseev, A. E., Kennedy, M. E., Navarro, B., and Terzic, A. (1997) Burst kinetics of co-expressed Kir6.2/SUR1 clones: comparison of recombinant with native ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel behavior. *J. Membr. Biol.* **159**, 161–168
  39. D'hahan, N., Jacquet, H., Moreau, C., Catty, P., and Vivaudou, M. (1999) A transmembrane domain of the sulfonylurea receptor mediates activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels by K<sup>+</sup> channel openers. *Mol. Pharmacol.* **56**, 308–315
  40. Terzic, A., Findlay, I., Hosoya, Y., and Kurachi, Y. (1994) Dualistic behavior of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels toward intracellular nucleoside diphosphates. *Neuron* **12**, 1049–1058
  41. Dzeja, P., and Terzic, A. (1998) Phosphotransfer reactions in the regulation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *FASEB J.* **12**, 523–529
  42. Tucker, S. J., Gribble, F. M., Zhao, C., Trapp, S., and Ashcroft, F. M. (1997) Truncation of Kir6.2 produces ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the absence of the sulphonylurea receptor. *Nature (London)* **387**, 179–183
  43. Schwanstecher, M., Sieverding, C., Dorschner, H., Gross, I., Aguilar-Bryan, L., Schwanstecher, C., and Bryan, J. (1998) Potassium channel openers require ATP to bind to and act through sulfonylurea receptors. *EMBO J.* **17**, 5529–5535
  44. Uhe, I., Toman, A., Gross, I., Schwanstecher, C., and Schwanstecher, M. (1999) Identification of the potassium channel opener site on sulfonylurea receptors. *J. Biol. Chem.* **274**, 28079–28082
  45. Terzic, A., Jahangir, A., and Kurachi, Y. (1995) Cardiac ATP-sensitive K<sup>+</sup>-channels: regulation by intracellular nucleotides and K<sup>+</sup> channel opening drugs. *Am. J. Physiol.* **38**, C525–C545
  46. Aparicio, G., Buche, A., Mendez, C., and Salas, J. A. (1996) Characterization of the ATPase activity of the N-terminal nucleotide binding domain of an ABC transporter involved in oleomycin secretion by *Streptomyces antibioticus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **141**, 157–162
  47. Holland, I. B., and Blight, M. A. (1999) ABC-ATPases, adaptable energy generators fueling transmembrane movement of a variety of molecules in organism from bacteria to humans. *J. Mol. Biol.* **293**, 381–399
  48. Randak, C., Neth, P., Auerswald, E. A., Eckerskorn, C., Assfalg-machleidt, J., and Machleidt, W. (1997) A recombinant polypeptide model of the second nucleotide-binding fold of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator functions as an active ATPase. GTPase and adenylate kinase. *FEBS Lett.* **410**, 180–186

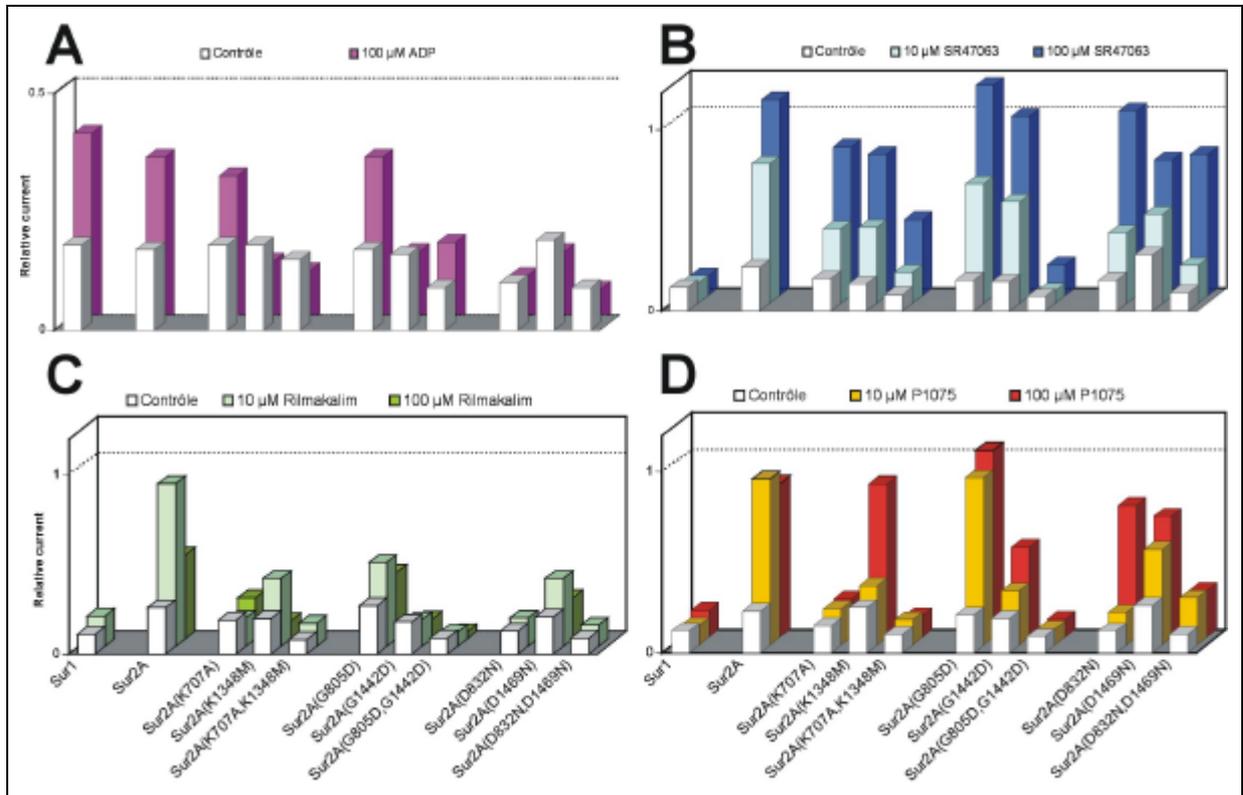
49. Wang, C., Castro, A. F., Wilkes, D. M., and Altenberg, G. A. (1999) Expression and purification of the first nucleotide binding domain and linker region of human multidrug resistance gene product: comparison of fusion to glutathione S-transferase, thioredoxin and maltose-binding protein. *Biochem. J.* **338**, 77–81
50. Li, C., Ramjeesingh, M., Wang, W., Garami, E., Hewryk, M., Lee, D., Rommens, J. M., Galley, K., and Bear, C. E. (1996) ATPase activity of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.* **271**, 28463–28468
51. Baukrowitz, T., Hwang, T. C., Gadsby, D. C., and Nairn, A. C. (1994) Coupling of CFTR Cl<sup>-</sup> channel gating to an ATP hydrolysis cycle. *Neuron* **12**, 473–482
52. 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<sup>+</sup>-ATP channels. *Neuron* **22**, 537–548
53. Sharma, N., Crane, A., Clement, J. P., Gonzalez, G., Babenko, A. P., Bryan, J., and Aguilar-Bryan, L. (1999) The C-terminus of SUR1 is required for trafficking of K<sub>ATP</sub> channels. *J. Biol. Chem.* **274**, 20628–20632
54. Ueda, K., Inagaki, N., and Seino, S. (1997) MgADP antagonism to Mg<sup>2+</sup>-independent ATP binding of the sulfonylurea receptor SUR1. *J. Biol. Chem.* **272**, 22983–22986
55. Ueda, K., Matsuo, M., Tanabe, K., Morita, K., Kioka, N., and Amachi, T. (1999) Comparative aspects of the function and mechanism of SUR1 and MDR1 proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1461**, 305–313
56. Sharma, S., and Rose, D. (1995) Cloning, overexpression, purification, and characterization of the carboxyl-terminal nucleotide-binding domain of P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **270**, 14085–14093
57. Schultz, B. D., Bridges, R. J., and Frizzell, R. A. (1996) Lack of conventional ATPase properties in CFTR chloride channel gating. *J. Membr. Biol.* **151**, 63–75
58. Urbatsch, I. L., Beaudet, L., Carrier, I., and Gros, P. (1998) Mutations in either nucleotide-binding site of P-glycoprotein (Mdr3) prevent vanadate trapping of nucleotide at both sites. *Biochemistry* **37**, 4592–4602
59. Carson, M. R., Travis, S. M., and Welsh, M. J. (1995) The two nucleotide-binding domains of cystic-fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) have distinct functions in controlling channel activity. *J. Biol. Chem.* **270**, 1711–1717
60. Nichols, C. G., and Lederer, W. J. (1990) The regulation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel activity in intact and permeabilized rat ventricular myocytes. *J. Physiol.* **423**, 91–110
61. Terzic, A., Jahangir, A., and Kurachi, Y. (1994) HOE-234, a second generation K<sup>+</sup> channel opener, antagonizes the ATP-dependent gating of cardiac ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **268**, 818–825
62. Dzeja, P. P., Pucar, D., Redfield, M. M., Burnett, J. C., and Terzic, A. (1999) Reduced activity of enzymes coupling ATP-generating with ATP-consuming processes in the failing myocardium. *Mol. Cell. Biochem.* **201**, 33–40
63. Abraham, M. R., Alekseev, A. E., Dzeja, P. P., Pucar, D., and Terzic, A. (1999) Creatine kinase-catalyzed phosphoryl flux is an essential regulator of cardiac K<sub>ATP</sub> channels. *The Physiologist* **42**, A-5 (abstract)
64. Venkatesh, N., Stuart, J., Lamp, S., Alexander, L. D., and Weiss, J. N. (1992) Activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels by cromakalim—effects of cellular K<sup>+</sup> loss and cardiac function in ischemic and reperfused mammalian ventricle. *Circ. Res.* **71**, 1324–1333
65. Gross, G. J., and Fryer, F. M. (1999) Sacolemmal versus mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels and myocardial preconditioning. *Circ. Res.* **84**, 973–979
66. Hambrock, A., Loffler-Walz, C., Kloor, D., Delabar, U., Horio, Y., Kurachi, Y., and Quast, U. (1999) ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel modulator binding to sulfonylurea receptors SUR2A and SUR2B: opposite effects of MgADP. *Mol. Pharmacol.* **55**, 832–840

Received for publication January 12, 2000.

Revised for publication March 22, 2000.

### 6.1.3.3. Interactions différentes entre les ouvreurs et les NBD

Les ouvreurs et les NBD interagissent donc, mais leur inter-dépendance est elle identique pour chaque NBD et pour chaque ouvreurs ? Pour le vérifier, nous avons testé trois ouvreurs de classes chimiques différentes (le SR47063, le P1075, le HOE234) sur des mutants du NBD1, du NBD2, et des deux NBD (Figure 36).



**Figure 36 :** Effet des mutations simples et doubles des NBD de SUR2A sur l'action de différents ouvreurs.

Les mutations ont été créées au niveau des résidus "catalytiques" des Walker, et plus précisément la lysine des motifs Walker A connue pour se lier au niveau des groupements phosphate, ainsi que l'aspartate des motifs Walker B qui forme des liaisons avec le magnésium. Les mutants glycine correspondent à des mutations naturelles retrouvées chez certaines personnes souffrant d'hyperinsulinémie familiale. La fonction de ce résidu n'est pas connu, mais son emplacement semble stratégiquement situé dans la région "linker", puisque sa ou ses mutation(s), tout comme celle des résidus "catalytiques", annihile(nt) toute fonctionnalité du ou des NBD. De plus, tout dysfonctionnement du NBD2 devrait abolir toute activation du canal par l'ADP. Cette situation est effectivement observée sur la Figure 36A pour les mutants SUR2A(K1349M), SUR2A(G1442D), SUR2A(D1469N) et les double mutants, mais également pour le mutant du NBD1 SUR2A(D832N) indiquant que ce

résidu, et par conséquent la fixation de  $Mg^{2+}$  sur le NBD1, est essentiel à l'activation des canaux  $K_{ATP}$  par l'ADP.

Contrairement à ce que nous aurions pu imaginer, les ouvreurs ont des réactions différentes pour une même mutation. Ainsi, globalement le SR47063 active tous les mutants, mis à part SUR2A(G805D,G1442D), tandis que le HOE234 devient inefficace sur la presque totalité des mutants testés, et plus surprenant, la lysine et l'aspartate du NBD1 sont plus critiques pour l'action de cet ouvreur que ceux du NBD2. Le P1075 induit des réactions semblables à celles observées avec le SR47063, sauf pour le mutant K707A.

Tous ces résultats révèlent le caractère extrêmement complexe des interactions entre les ouvreurs et les domaines de liaison des nucléotides. Aucun mécanisme d'action commun ne se dégage pour les trois ouvreurs testés. Plus troublant encore, ces résultats démontrent que l'action du SR47063 et du P1075 n'est pas corrélée avec la production d'ADP et/à sa stabilisation dans le NBD2.

Le bilan sommaire de ces données indique que le SR47063 ne nécessite pas de NBD fonctionnels pour son action, qu'au contraire le HOE234 voit ses effets annihilés par chaque mutation des NBD et que l'activation par le P1075 est principalement affectée par les mutations du NBD1 et des lysines, suggérant une dépendance vis à vis de la fixation correcte des groupements phosphates de l'ATP. Le seul point commun de ces mutations est l'absence totale d'activation du double mutant SUR2A(G805D,G1442D). La particularité de ce mutant pourrait résider dans la proximité spatiale des deux glycines de la région "linker". La double mutation en aspartate, résidu chargé négativement, créerait une répulsion électrostatique, déstabilisant ainsi la structure des NBD et empêchant le récepteur des sulfonylurées d'adopter la conformation activatrice du canal. Cependant cette hypothèse coïncide mal avec les structures des NBD cristallisés.

A noter que ces résultats confortent notre choix du SR47063 comme modèle dans la recherche du site de fixation des ouvreurs, nous affranchissant ainsi de toute dépendance vis à vis de l'hydrolyse des nucléotides, simplifiant grandement l'interprétation des résultats présentés ci-dessous.

## **6.2. Localisation du site de fixation des ouvreurs**

### **6.2.1. Principe**

L'approche chimérique employée pour localiser le site de fixation des ouvreurs est fondée sur les différences de sensibilité de l'isoforme SUR1 et de l'isoforme SUR2A vis à vis de ces produits. En effet, SUR1 est sensible au diazoxide mais pas au cromakalim (SR47063), ni au pinacidil (P1075), ni au rilmakalim (HOE234), et réciproquement, SUR2A est insensible au diazoxide, mais est activé par les trois ouvreurs cités ci-dessus.

En tirant profit de la forte homologie entre ces deux protéines et de la modularité structurale des transporteurs ABC, une première chimère a été construite dans sa partie Nter des domaines de SUR1 et dans sa partie Cter, ceux de SUR2A. Si des domaines importants pour l'action spécifique des ouvreurs sont conservés, nous pourrions observer leurs effets activateurs sur les canaux  $K_{ATP}$  chimériques exprimés dans les ovocytes de *Xénopes*, et caractérisés par la technique de patch clamp. Les recherches sont affinées par la construction de nouvelles chimères contenant des régions moins importantes de SUR2A pour se conclure par la caractérisation de mutants ponctuels de SUR1 ne contenant qu'un résidu de SUR2A.

### **6.2.2. Méthodes**

Les méthodes de biologie moléculaire utilisées sont la PCR avec amorces chevauchantes (SOE) pour la construction des chimères ou des oligonucléotides comportant une mutation ponctuelle pour la mutagenèse dirigée, suivie par la transformation de bactéries compétentes *E. coli* avec l'ADNc, ainsi que la purification d'ADN par mini-prep, la vérification des clones par digestion enzymatique, la purification d'ADN par midi-prep puis la transcription in vitro en ARNc contenant des séquences d'expression protéique dans les ovocytes de *Xénopes*.

Les ARNc de Kir6.2 et de SUR sauvage, chimérique ou mutant sont ensuite micro-injectés dans des ovocytes de *Xénopes*, puis traduits durant la période d'incubation de 2 jours minimum à 19°C.

Les mesures en patch clamp se font selon le même protocole que celui décrit dans le paragraphe "méthodes" précédent.

### 6.2.3. Résultats et interprétations

Les résultats des premières chimères sont présentés dans la publication D'hahan et al., 1999. Ils démontrent que les canaux recombinants clonés et exprimés dans les ovocytes de *Xénopus*, sont à la fois fonctionnels et présentent les mêmes caractéristiques que les canaux  $K_{ATP}$  de type sauvage vis à vis de leur affinité pour l'ATP ( $K_i=16\mu M$ ) (*Figure 1* ; D'hahan et al., 1999), de leur spécificité pharmacologique (*Figure 2* ; D'hahan et al., 1999), et de leur dépendance vis à vis du magnésium pour l'activation des canaux contenant SUR1 par le diazoxide (*Figure 3* ; D'hahan et al., 1999).

Les trois premières chimères caractérisées, à savoir Chim1, Chim4 et Chim6 schématisées en *Figure 4* (D'hahan et al., 1999), sont fonctionnelles et présentent des profils d'inhibition par l'ATP semblables à ceux des canaux de type sauvage ( $K_i = 11 \mu M$  pour Chim1,  $K_i = 20 \mu M$  pour Chim4,  $K_i$  non déterminé pour Chim6) (*Figure 5* ; D'hahan et al., 1999).

Démonstration faite de la validité de cette approche chimérique, les premiers résultats sur la spécificité pharmacologique des protéines chimériques sont surprenants de clarté. Chim1 composée pour "moitié" de SUR1 et SUR2A, est activée à la fois par l'activateur de SUR1 (diazoxide) et par l'activateur de SUR2A (SR47063) (*Figure 6A* ; D'hahan et al., 1999). Les amplitudes sont proches de celles observées sur SUR2A pour le SR47063 et plus faible, mais toujours significatives, que celles observées sur SUR1 pour le diazoxide, (*Figure 7A et B* ; D'hahan et al., 1999). La première interprétation sur la localisation du site de fixation des ouvreurs, en est ainsi facilitée: le SR47063 se fixe dans la région TMD2-NBD2 de SUR2A, tandis que le diazoxide se fixe sur un site différent situé dans la région TMD0-TMD1-NBD1 de SUR1. Cependant, l'action du diazoxide n'est pas aussi évidente qu'il y paraît, puisque SUR2B, qui ne se différencie de SUR2A que par 28 résidus des derniers 42 résidus du domaine C-terminal, est également activé par le diazoxide, laissant supposer que ce domaine Cter est impliqué dans l'action du diazoxide, hypothèse invalidée par les résultats sur Chim1.

Puisque le diazoxide active les deux isoformes (cf résultats précédents), l'étude de localisation du site de fixation des ouvreurs se focalise alors sur le SR47063, avec la caractérisation de Chim4 et Chim6, contenant des domaines plus petits de SUR2A. Les *Figures 6B, 6C, 7A et 7C* (D'hahan et al., 1999) révèlent que le deuxième domaine transmembranaire de SUR2A (TMD2) est nécessaire (absence

d'activation de Chim4) et suffisant (activation de Chim6) pour l'action du SR47063 sur les canaux  $K_{ATP}$ .

# A Transmembrane Domain of the Sulfonylurea Receptor Mediates Activation of ATP-Sensitive $K^+$ Channels by $K^+$ Channel Openers

NATHALIE D'HAHAN, HÉLÈNE JACQUET, CHRISTOPHE MOREAU, PATRICE CATTY, and MICHEL VIVAUDOU

Laboratoire de Biophysique Moléculaire et Cellulaire, Département de Biologie Moléculaire et Structurale, Commissariat à l'Energie Atomique, Grenoble, France

Received February 4, 1999; accepted May 2, 1999

This paper is available online at <http://www.molpharm.org>

## ABSTRACT

ATP-sensitive  $K^+$  ( $K_{ATP}$ ) channels are a complex of an ATP-binding cassette transporter, the sulfonylurea receptor (SUR), and an inward rectifier  $K^+$  channel subunit, Kir6.2. The diverse pharmacological responsiveness of  $K_{ATP}$  channels from various tissues are thought to arise from distinct SUR isoforms. Thus, when assembled with Kir6.2, the pancreatic  $\beta$  cell isoform SUR1 is activated by the hyperglycemic drug diazoxide but not by hypotensive drugs like cromakalim, whereas the cardiac muscle isoform SUR2A is activated by cromakalim and not by diazoxide. We exploited these differences between SUR1 and SUR2A to pursue a chimeric approach designed to identify the structural determinants of SUR involved in the pharmacological activation of  $K_{ATP}$  channels. Wild-type and chimeric SUR were coexpressed with Kir6.2 in *Xenopus* oocytes, and we studied

the resulting channels with the patch-clamp technique in the excised inside-out configuration. The third transmembrane domain of SUR is found to be an important determinant of the response to cromakalim, which possibly harbors at least part of its binding site. Contrary to expectations, diazoxide sensitivity could not be linked specifically to the carboxyl-terminal end (nucleotide-binding domain 2) of SUR but appeared to involve complex allosteric interactions between transmembrane and nucleotide-binding domains. In addition to providing direct evidence for the structure-function relationship governing  $K_{ATP}$  channel activation by potassium channel-opening drugs, a family of drugs of the highest therapeutic interest, these findings delineate the determinants of ligand specificity within the modular ATP-binding cassette-transporter architecture of SUR.

ATP-sensitive  $K^+$  ( $K_{ATP}$ ) channels are present in the plasma membrane of muscle cells, neurons, and most other excitable cells, where they serve to adjust the resting membrane potential to the metabolic state of the cell (Ashcroft and Ashcroft, 1990; Isomoto and Kurachi, 1997). These channels are the targets of a number of drugs that can block them, like the sulfonylureas, or open them, like cromakalim, pinacidil, or diazoxide (Gopalakrishnan et al., 1993). These drugs are of great therapeutic interest because they provide a way to pharmacologically adjust the excitability of cells, raising it with blockers and lowering it with openers. Widespread use of potassium channel openers (KCOs) is impaired, however, by their poor tissue specificity and somewhat low affinity

(Lawson, 1996). In the search for better drugs, specially in terms of specificity, it appears necessary to obtain a better understanding of the mechanisms of action of these pharmacological agents.

The  $K_{ATP}$  channel is a complex of two proteins: the sulfonylurea receptor (SUR; Aguilar-Bryan et al., 1995), which is a member of the ATP-binding cassette (ABC) transporter family, and a smaller protein, Kir6.2 (Inagaki et al., 1995), which belongs to the inward rectifier  $K^+$  channel family. Four Kir6.2 subunits assemble to form a  $K^+$ -selective pore that is rendered functional by 4 auxiliary SUR subunits (Clement et al., 1997; Inagaki et al., 1997; Shyng and Nichols, 1997) through direct physical association (Lorenz et al., 1998).

Several isoforms of SUR have been identified. When the isoforms SUR1, SUR2A, or SUR2B are coexpressed with Kir6.2, channels are reconstituted that resemble native  $K_{ATP}$  channels from pancreatic  $\beta$  cells, cardiac muscle, and smooth muscle (Inagaki et al., 1995, 1996; Isomoto et al., 1996). The variable tissue-specific properties, particularly the response to openers, of  $K_{ATP}$  channels would then arise from the identity of the SUR

This work was supported by grants from Association Française contre les Myopathies and Association Française de Lutte contre la Mucoviscidose. Additional support was provided by Commissariat à l'Energie Atomique and Centre National de la Recherche Scientifique. N.D., H.J., and C.M. were supported by a fellowship from La Société des Amis des Sciences, a studentship from Association pour la Recherche contre le Cancer, and a studentship from La Ligue contre le Cancer, respectively. A preliminary account of this work has been published in abstract form [Jacquet H, D'ahan N, Moreau C and Vivaudou M (1999) A transmembrane domain of the sulfonylurea receptor mediates activation of K-ATP channels by K-channel-openers. *Biophys J* 76:A413].

**ABBREVIATIONS:** SUR, sulfonylurea receptor; KCO, potassium channel opener;  $K_{ATP}$  channel, ATP-sensitive potassium channel; TMD, transmembrane domain; NBD, nucleotide-binding domain; DMSO, dimethyl sulfoxide; PCR, polymerase chain reaction; ABC, ATP-binding cassette.

isoform expressed in that tissue. This observation, as well as more direct functional (Tucker et al., 1997) and biochemical (Schwanstecher et al., 1998) evidence, designates SUR as the primary target of KCOs. Presently, scarce structural data are available on the underlying mechanism of action of KCOs. It is well established that the nucleotide-binding domains of SUR are tightly linked to the sites of action of KCOs because the binding and effect of KCOs require hydrolyzable nucleotides and are compromised by mutations that, in other ABC transporters, impair the ability of these domains to bind and hydrolyze nucleotides (Gribble et al., 1997; Shyng et al., 1997; Schwanstecher et al., 1998). It has also been suggested that the carboxyl terminus of SUR could play an important role in this mechanism because SUR2A and SUR2B differ only in their last 42 amino acids but give rise to channels with very distinct apparent KCO affinity (Isomoto et al., 1996; Schwanstecher et al., 1998).

As an ABC transporter (Croop, 1998), SUR is organized as a modular protein with clearly identifiable transmembrane domains and cytoplasmic nucleotide-binding domains (Aguilar-Bryan et al., 1998). Taking advantage of the differential sensitivity to the openers diazoxide and cromakalim of two SUR isoforms, the pancreatic isoform SUR1 (diazoxide-sensitive, cromakalim-insensitive) and the cardiac isoform SUR2A (diazoxide-insensitive, cromakalim-sensitive), we have followed a chimeric approach to examine whether specific domains of SUR are involved in the activation of  $K_{ATP}$  channels by these KCOs.

## Materials and Methods

**Molecular Biology.** Mouse Kir6.2 (GenBank accession no. D50581; Inagaki et al., 1995), hamster SUR1 (GenBank accession no. L40623; Aguilar-Bryan et al., 1995), and rat SUR2A (GenBank accession no. D83598; Inagaki et al., 1996) were subcloned in the *Xenopus* oocyte expression vector pGEMHE (Liman et al., 1992) or its modified versions with enhanced polylinkers, pGH2 and pGH3 (kindly provided by Dr. F. Pagès, Grenoble). Three nonsilent differences were found between the hamster SUR1 cDNA sequence and the published sequence: G<sup>3601</sup>C, T<sup>3751</sup>C, and A<sup>4099</sup>G, which produce the amino acid changes V<sup>1201</sup>L, C<sup>1251</sup>R, and T<sup>1367</sup>A. Because these residues are also Leu, Arg, and Ala in all other rat, mouse, and human SUR1 and SUR2 isoforms, it is likely that these differences were due to errors in the original sequence.

Chimeric cDNA constructs were produced by the splicing by overlap extension polymerase chain reaction (PCR) technique (Horton et al., 1989). Hamster SUR1 and rat SUR2A were used as templates for making all of the chimeras listed in Fig. 4. Successive PCRs with Vent DNA polymerase (New England Biolabs, Beverly, MA) were performed for 25 cycles to produce the junctional cDNA fragments, which had a length of 2 kilobase pairs or less. These fragments were ligated to the flanking 5' and 3' remaining sequence elements to produce the final constructs. Plasmid DNAs were amplified, confirmed by restriction analysis and by sequencing of the PCR-derived region, linearized, and transcribed in vitro with the T7 mMessage mMachine kit (Ambion, Austin, TX). cRNAs were electrophoresed on formaldehyde gels, and concentrations were estimated from two dilutions with RNA marker as a standard.

**Electrophysiology.** *Xenopus laevis* were anesthetized with 3-aminobenzoic acid ethyl ester (1 g/liter water). Part of one ovary was removed, the incision was sutured, and the animal was allowed to recover. Stage V or VI oocytes were defolliculated by an ~60-min incubation at 19°C with 2 mg/ml type A collagenase (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Selected oocytes were injected the next day with 50 nl of water containing ~2 ng of Kir6.2 cRNA and with ~6 ng of

cRNA encoding wild-type or chimeric SURs. They were stored at 19°C in a modified Barth's solution with 1 mM KCl, 0.82 mM MgSO<sub>4</sub>, 88 mM NaCl, 2.4 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.41 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.3 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, and 16 mM HEPES (pH 7.4) supplemented with 100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin, and 100 μg/ml gentamycin.

Two to 15 days after injection, oocytes were devitelized, and exogenous  $K_{ATP}$  channels were characterized by the patch-clamp technique in the excised inside-out configuration (Hamill et al., 1981). Experimental methods were similar to those used in our laboratory to record native frog skeletal muscle  $K_{ATP}$  channels (Vivaudou and Forestier, 1995; Forestier et al., 1996).

Conditions were designed to optimize recording of  $K_{ATP}$  currents and to minimize contributions by endogenous oocyte Cl<sup>-</sup> currents. Patch pipettes (2–10 MΩ) contained 154 mM K<sup>+</sup>, 146 mM Cl<sup>-</sup>, 5 mM Mg<sup>2+</sup>, and 10 mM piperazine-*N,N'*-bis(2-ethanesulfonic acid) (pH 7.1). The cytoplasmic face of the patch was bathed in solutions, all of which contained 174 mM K<sup>+</sup>, 40 mM Cl<sup>-</sup>, 1 mM EGTA, 10 mM piperazine-*N,N'*-bis(2-ethanesulfonic acid) (pH 7.1), and methanesulfonate<sup>-</sup> as the remaining anions. When present, Mg<sup>2+</sup> was 1 mM. ATP (potassium salt; Sigma Chemical Co.), diazoxide [100 mM stock in dimethyl sulfoxide (DMSO); Sigma Chemical Co.], and SR47063 (20 mM stock in DMSO; Sanofi Recherche, Montpellier, France) were added as specified. The concentration of contaminant Mg<sup>2+</sup> in nominally Mg<sup>2+</sup>-free solutions was less than 10 μM (Forestier and Vivaudou, 1993). The membrane potential was maintained at -50 mV. Experiments were conducted at room temperature (22–24°C).

Applications of the various solutions to the intracellular face of the patch were performed with a RSC-100 rapid solution changer (Bio-Logic, Claix, France) controlled by in-house software Perf 2.10. Analog signals were filtered at 300 Hz and sampled at 1 kHz. Slow fluctuations of the no-channel-open baseline of the signal were removed by interactive fitting of the baseline with a spline curve and subtraction of this fit from the signal. Acquisition, analysis, and presentation were performed with in-house software Erwin 3.2. ATP dose-response curves were obtained and processed as in Vivaudou and Forestier (1995). Results are displayed as mean ± S.E.M.

## Results

**Expression of SUR1 and SUR2A/Kir6.2  $K_{ATP}$  Channels in Oocytes.** Oocytes coinjected with equimolar quantities of mRNAs encoding Kir6.2 (2 ng) and either SUR1 or SUR2A (6 ng) were found to express a high density of  $K_{ATP}$  channels within 2 days. In excised patches with small patch pipettes of ~5-MΩ resistance, macroscopic ATP-inhibitable currents of 100 pA or more at a membrane potential of -50 mV with 150 mM intracellular and extracellular K<sup>+</sup> could be recorded routinely.

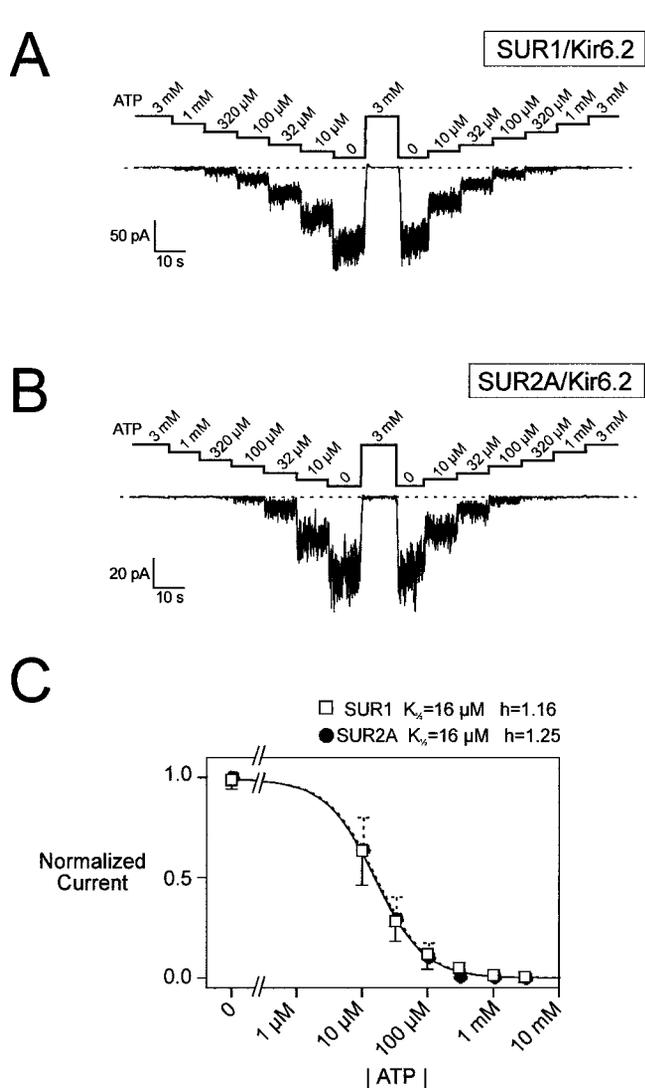
SUR1/Kir6.2 and SUR2A/Kir6.2 channels displayed weak inward rectification, had inward current conductances of ~70 picosiemens, were completely blocked by millimolar concentrations of internal ATP, and were inhibited by micromolar doses of glibenclamide (not shown). In our conditions, they displayed remarkably similar sensitivity to block by ATP (Fig. 1). The concentration of ATP causing 50% current inhibition ( $K_{1/2}$ ) was on average 16 μM in both cases, although it could vary between 2 and 200 μM from patch to patch, as observed with native channels (Findlay and Faivre, 1991; Vivaudou and Forestier, 1995).

**Pharmacological Properties of Wild-Type  $K_{ATP}$  Channels.** SUR1/Kir6.2 and SUR2A/Kir6.2 channels were clearly distinguishable on the basis of their pharmacological profiles. In agreement with previous reports (Inagaki et al., 1995, 1996), SUR1/Kir6.2 channels were activated by diazox-

ide but not by SR47063, a cromakalim analog, whereas the opposite was true for SUR2A/Kir6.2 channels (Fig. 2).

Application of 300  $\mu\text{M}$  diazoxide caused a rapidly reversible increase in the SUR1/Kir6.2 currents recorded in 100  $\mu\text{M}$  ATP and 1 mM  $\text{Mg}^{2+}$ . The magnitude of this effect was variable from patch to patch and decreased during the course of an experiment, as observed with native pancreatic  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channels (Kozlowski and Ashford, 1992; Larsson et al., 1993). Taking into account only the result of the first application in every patch (usually performed in the first 5 min after patch excision), diazoxide caused on average a more than 5-fold increase in current.

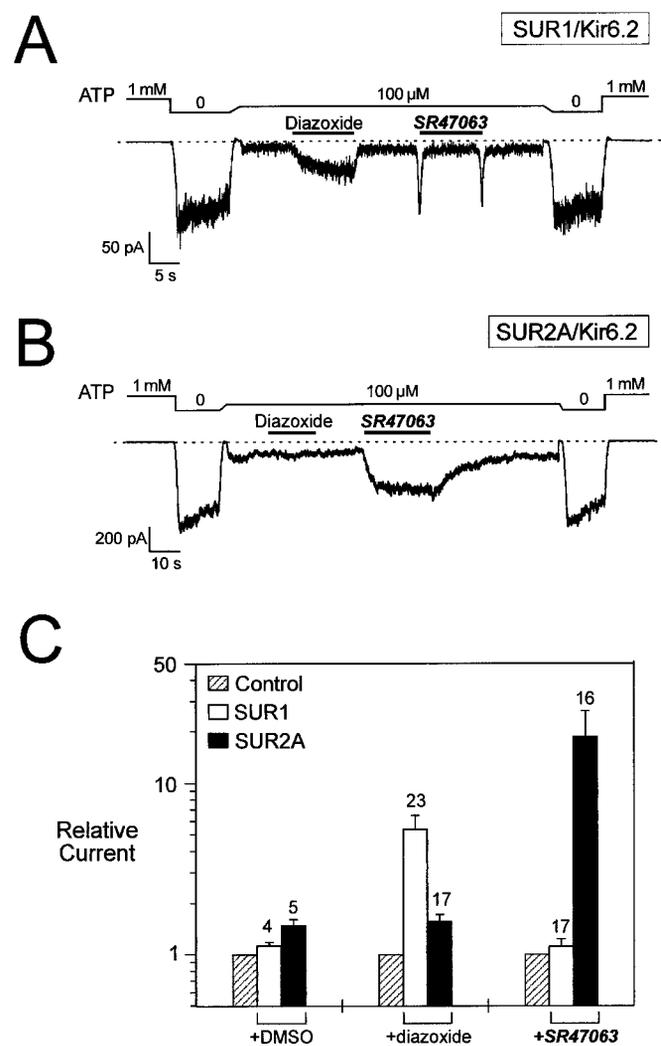
In oocytes expressing SUR2A and Kir6.2, diazoxide caused a much smaller,  $56 \pm 15\%$  ( $n = 17$ ) increase in current, but this could be attributed to the drug vehicle, DMSO, which alone increased current by  $48 \pm 12\%$  ( $n = 5$ ).



**Fig. 1.** Dose-dependent inhibition by ATP of SUR1/Kir6.2 and SUR2A/Kir6.2  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channels. A, representative current trace recorded at  $-50$  mV with 1 mM  $\text{Mg}^{2+}$  from an inside-out patch excised from an oocyte coexpressed with Kir6.2 and SUR1. B, Idem with SUR2A, patch 861502B. C, plots of activity of SUR1/Kir6.2 ( $\square$ ) and SUR2A/Kir6.2 ( $\bullet$ ) channels versus ATP concentration. Each symbol and bar represent the average and S.E.M. of measurements obtained in 12 SUR1 and 9 SUR2A patches using the protocols of A and B. Lines are best fits of the data points to the Hill equation with values of  $K_{1/2}$  and  $h$  of 15.8  $\mu\text{M}$  and 1.16 (SUR1) and 15.9  $\mu\text{M}$  and 1.24 (SUR2A).

In contrast, SR47063 (100  $\mu\text{M}$ ) consistently activated SUR2A/Kir6.2 channels, causing on average a 19-fold increase in current, but had no significant effect on SUR1/Kir6.2 channels because it produced the same increase ( $12 \pm 10\%$ ;  $n = 17$ ) as its vehicle alone ( $13 \pm 5\%$ ;  $n = 4$ ). Higher concentrations of this hydrophobic drug were not tested because they produced cloudy solutions, indicative of solubility problems.

**Magnesium Dependence of Opener Effects.** In an attempt to clarify the role of nucleotide hydrolysis on opener action, experiments were conducted on wild-type channels to determine whether the presence of  $\text{Mg}^{2+}$  affected activation by diazoxide or SR47063. In the presence of 100  $\mu\text{M}$  ATP, channel activity was higher when  $\text{Mg}^{2+}$  was present, which is consistent with recent data on the activatory role of



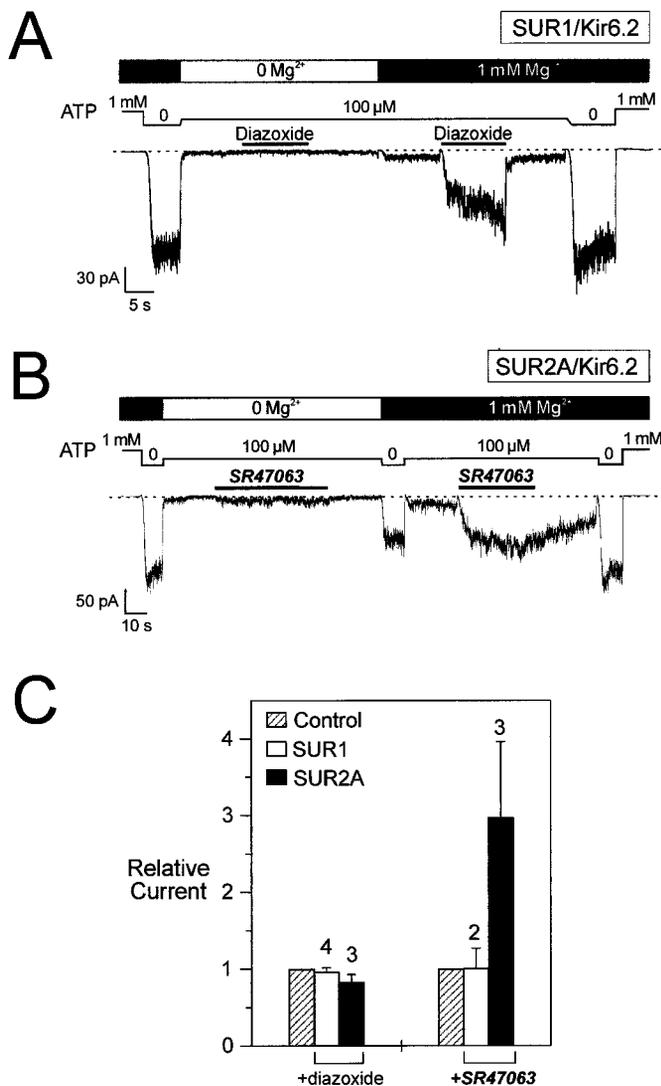
**Fig. 2.** Differential response to SR47063 and diazoxide of SUR1/Kir6.2 and SUR2A/Kir6.2  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channels. A, representative current trace recorded at  $-50$  mV from an inside-out patch excised from an oocyte coexpressed with Kir6.2 and SUR1. Transient currents on drug application and removal in this and other figures are artifacts of the solution-switching procedure due to brief exposure of the patch to ATP-free solution. B, Idem with SUR2A. C, normalized amplitude of currents measured before (Control) and during application of diazoxide, SR47063, or vehicle only (DMSO). Numbers above bars indicate the number of patches tested. Responses were recorded in the same manner as in A and B in the presence of 100  $\mu\text{M}$  ATP and 1 mM  $\text{Mg}^{2+}$  using 300  $\mu\text{M}$  diazoxide, 100  $\mu\text{M}$  SR47063, and 0.3% DMSO.

MgATP (Gribble et al., 1998a). Figure 3 shows that diazoxide becomes ineffective when  $Mg^{2+}$  is removed, an observation already reported for native (e.g., Dunne et al., 1987) and recombinant (Shyng et al., 1997) channels. This was not the case for SR47063, which retained part of its activatory potential in the nominal absence of  $Mg^{2+}$ , although its effect was much weaker than that with  $Mg^{2+}$  and rapidly reversed on washout of the drug (Fig. 2). To verify that this effect was not a residual effect due to contaminant  $Mg^{2+}$ , the experiments represented in Fig. 3B were repeated in the added presence of 5 mM EDTA. Under those conditions, contaminant  $Mg^{2+}$  estimated at 8  $\mu M$  (Forestier and Vivaudou, 1993) would be mostly chelated by EDTA, leaving  $\sim 7$  nM free  $Mg^{2+}$  and  $\sim 5$  nM MgATP. Still, SR47063 augmented SUR2A/Kir6.2 currents by  $\sim 3$ -fold ( $2.87 \pm 0.61$ ;  $n = 5$ ), whereas its

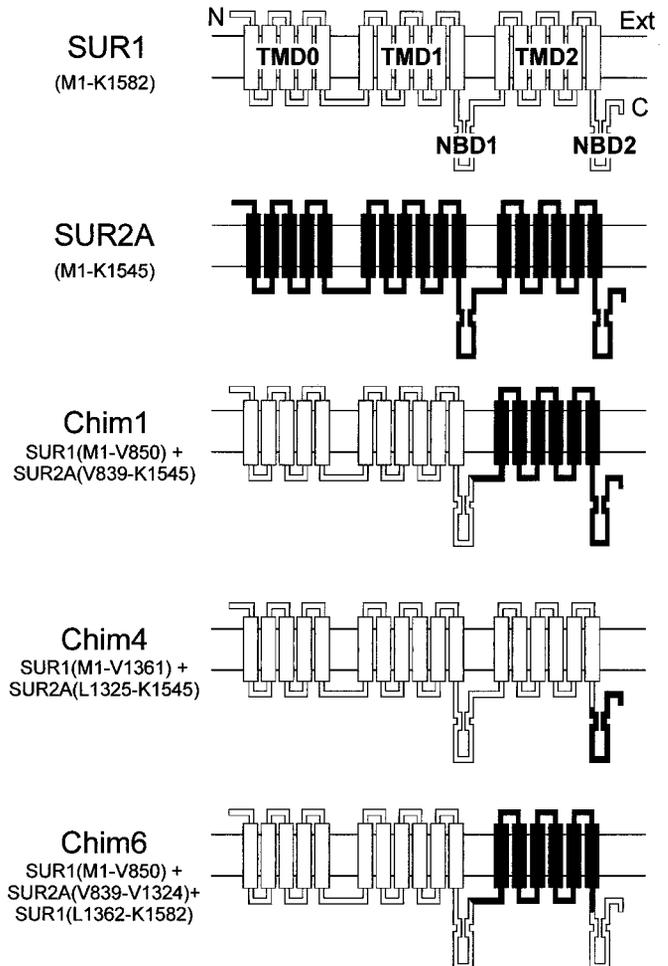
vehicle alone, 0.5% DMSO, had a negligible effect in those experiments (test/control =  $0.92 \pm 0.06$ ;  $n = 4$ ; data not shown).

**Design and Expression of Chimeric SUR Receptors.** The high sequence homology between SUR1 and SUR2A (67% identity) suggests that they have very similar structures. The clear dichotomy in terms of pharmacological properties of these two highly homologous proteins suggested that a chimeric approach could constitute a viable strategy to pinpoint the regions of SUR responsible for its pharmacological phenotype.

On the basis of hydrophobicity profiles and comparison with other ABC transporters (Tusnady et al., 1997), SUR may be divided in five domains, as shown in Fig. 4: three transmembrane domains (TMDs; TMD0, TMD1, and TMD2) and two cytoplasmic nucleotide-binding domains (NBD1 and NBD2). These last two domains, which incorporate Walker A and Walker B motifs capable of forming an ATP-binding pocket (Walker et al., 1982), are the most conserved regions of ABC transporters and the most homologous regions of SUR1 and SUR2A. In some ABC transporters, distinct pro-



**Fig. 3.** Magnesium dependence of activation by SR47063 and diazoxide of SUR1/Kir6.2 and SUR2A/Kir6.2  $K_{ATP}$  channels. A, responses to diazoxide (300  $\mu M$ ) before and after the addition of 1 mM  $Mg^{2+}$  of currents recorded at  $-50$  mV from an inside-out patch excised from an oocyte coinjected with Kir6.2 and SUR1. B, responses to SR47063 (100  $\mu M$ ) of SUR2A/kir6.2 channels. C, normalized amplitude of currents measured in the absence of  $Mg^{2+}$  before (Control) and during application of diazoxide or SR47063. Numbers above bars indicate the number of patches tested. Responses were recorded as in A and B in the presence of 100  $\mu M$  ATP with no added  $Mg^{2+}$ .



**Fig. 4.** Nomenclature and topology of chimeric constructs. SUR is represented as a modular transmembrane protein with an extracellular amino-terminal; an intracellular carboxyl-terminal; three transmembrane domains, TMD0, TMD1, and TMD2; and two cytoplasmic nucleotide binding domains, NBD1 and NBD2. Rectangular boxes indicate postulated transmembrane helices (Tusnady et al., 1997). SUR1 and SUR2A sequence elements are drawn in white and black, respectively. The exact amino acid composition of each construct is specified at the left.

teins form each of these domains (Croop, 1998), suggesting that each domain is a structurally and functionally independent module. Therefore, we designed chimeras along the logic of this modular architecture.

The three chimeras presented in this report are arbitrarily named Chim1, Chim4, and Chim6. Chim1 merges in roughly the first half of SUR1 and second half of SUR2A, that is, domains TMD0, TMD1, and NBD1 of SUR1 and TMD2 and NBD2 of SUR2A. Chim4 incorporates domains TMD0, TMD1, TMD2, and NBD1 of SUR1 and NBD2 of SUR2A. Chim6 incorporates domains TMD0, TMD1, NBD1, and NBD2 of SUR1 and TMD2 of SUR2A (Fig. 4).

Oocytes coinjected with cRNAs coding for each of these chimeras (6 ng) and Kir6.2 (2 ng) produced robust ATP-inhibited  $K^+$ -selective currents. The underlying chimeric channels had properties identical with those shared by the wild-type channels, including conductance, rectification, and blockade by glibenclamide (data not shown), confirming their structural integrity. Because the wild-type channels showed similar sensitivity to ATP inhibition, it did not come as a surprise that the ATP sensitivity of chimeric channels stayed within the same range as shown in Fig. 5. Chim1 and Chim4/Kir6.2 channels were half-blocked by 11 and 20  $\mu$ M, respectively, values not significantly different from the 16  $\mu$ M of SUR1 and SUR2A/Kir6.2 channels.

**Effects of KCOs on Chimeric  $K_{ATP}$  Channels.** The responses to diazoxide and SR47063 of the chimeric channels were tested. Results are illustrated in Fig. 6 and summarized in Fig. 7. Unlike either SUR1 or SUR2A, Chim1 associated with Kir6.2 was activated by both openers. Although a lack of response would have been difficult to interpret, this gain-of-function phenotype suggests that Chim1 acquired diazoxide sensitivity from its SUR1 regions (TMD0, TMD1, and NBD1) and SR47063 sensitivity from its SUR2A regions (TMD2 and NBD2). The response of this chimera to diazoxide was intermediate between that of SUR2A (mainly due to vehicle as discussed above) and that of SUR1, suggesting that domains in both halves of SUR participate in that response. In contrast, the robust response to SR47063 suggests a tight link between this opener and the second half of SUR (TMD2 + NBD2).

To identify precisely which domain was responsible for SR47063 activation, Chim4 and Chim6 were constructed. These are identical with SUR1 except for a single domain contributed by SUR2A: NBD2 for Chim4 and TMD2 for Chim6. Functionally, Chim4/Kir6.2 channels could barely be distinguished from SUR1/Kir6.2 channels. They were activated by diazoxide, although to a lesser extent, but not by SR47063. Chim6/Kir6.2 channels were sensitive to SR47063 like SUR2A/Kir6.2, but their response to diazoxide was significantly weaker than that of SUR1/Kir6.2 channels.

If these results demonstrate the essential role of TMD2 in the action of SR47063, they do not incriminate a single domain as crucial for diazoxide but rather suggest contributions from several domains in both halves of the protein.

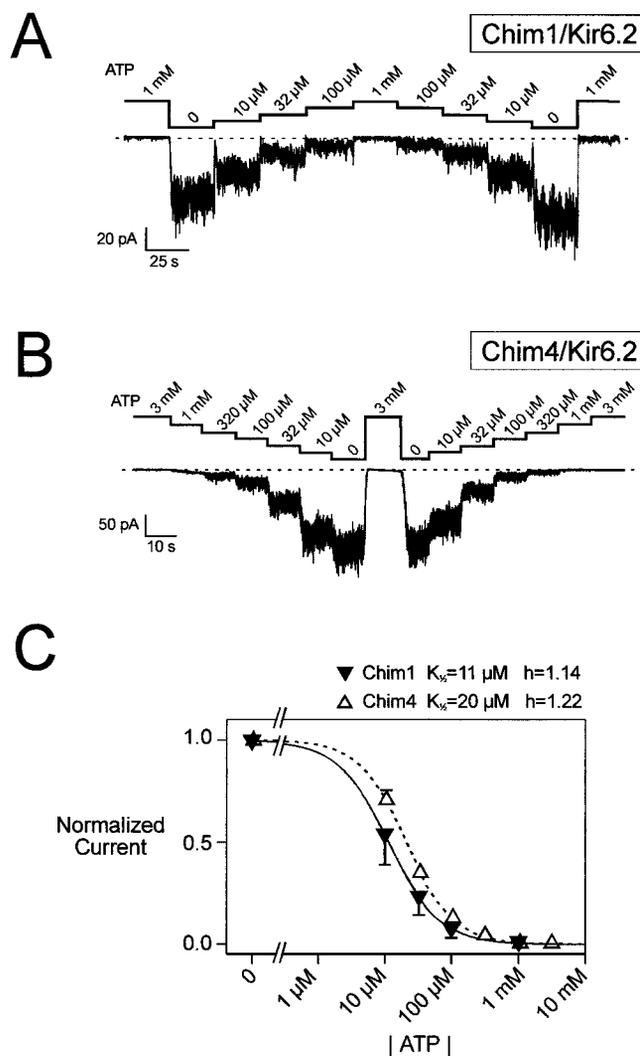
## Discussion

**Identical ATP Sensitivity of SUR1 and SUR2A/Kir6.2  $K_{ATP}$  Channels.** In agreement with recently published data (Gribble et al., 1998b), we found that SUR1 and SUR2A/Kir6.2 channels had the same sensitivity to block by intra-

cellular ATP. For both, the concentration of ATP for 50% inhibition ( $K_{1/2}$ ) was 16  $\mu$ M and the Hill coefficient was slightly above 1, suggesting at least two coupled nucleotide-binding sites. In agreement with this observation, all SUR1/SUR2A chimeras displayed  $K_{1/2}$  values that were not significantly different.

For SUR2A/Kir6.2 channels, the  $K_{1/2}$  value was below the values of 30 to 150  $\mu$ M reported by others in transfected cells (Inagaki et al., 1996; Aguilar-Bryan et al., 1998; Okuyama et al., 1998). We do not know the reason for this discrepancy. Even in well-controlled conditions, ATP sensitivity is unstable (Findlay and Faivre, 1991) and could well change with the expression system where the presence and amount of certain channel-regulating factors, such as membrane phospholipids (Fan and Makielski, 1997), remain unpredictable.

Therefore, constituent SUR isoforms cannot be identified dependably on the responses to ATP of  $K_{ATP}$  channels. As far



**Fig. 5.** Dose-dependent inhibition by ATP of chimeric  $K_{ATP}$  channels. A, representative current trace recorded at  $-50$  mV with 1 mM  $Mg^{2+}$  from an inside-out patch excised from an oocyte coinjected with Kir6.2 and Chim1. B, Idem with Chim4. C, plots of activity of Chim1/Kir6.2 ( $\blacktriangledown$ ) and Chim4/Kir6.2 ( $\triangle$ ) channels versus ATP concentration. Each symbol and bar represent the average and S.E.M. of 2 to 13 measurements obtained using the protocols of A and B. Lines are best fits of the data points to the Hill equation with values of  $K_{1/2}$  and  $h$  of 11.4  $\mu$ M and 1.14 (Chim1) and 20.0  $\mu$ M and 1.22 (Chim4).

as we can tell, in *Xenopus* oocytes, SUR1/Kir6.2 and SUR2A/Kir6.2  $K_{ATP}$  channels can be separated with confidence only on the basis of their pharmacological properties.

#### Essential Role of TMD2 Domain in SR47063 Action.

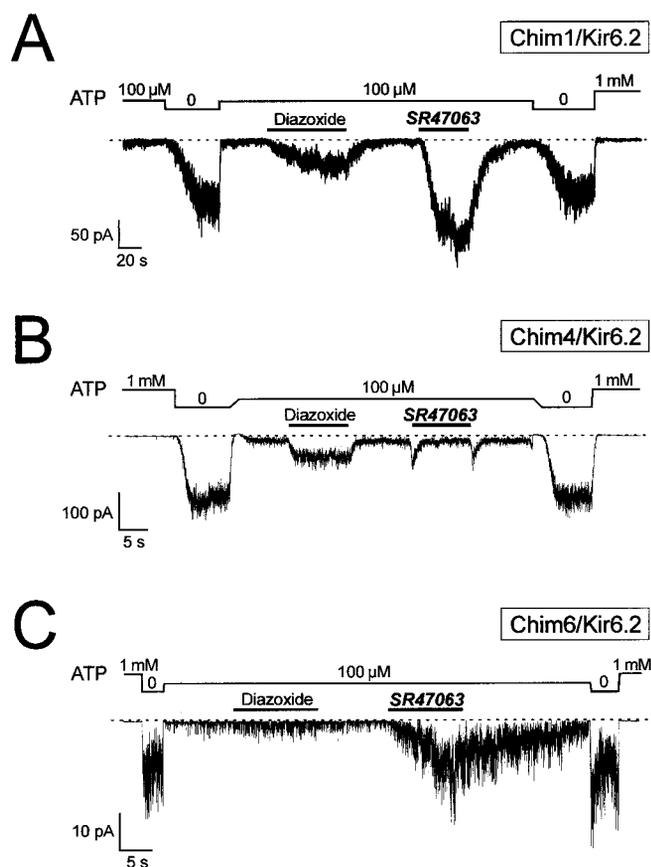
The high sequence homology and clear pharmacological divergence of SUR1 and SUR2A make these proteins perfect candidates for a chimeric approach. The two SUR isoforms used, hamster SUR1 and rat SUR2A, indeed have very homologous primary sequences. Overall, 79% of their amino acids are conserved, with identical amino acids amounting to 67% of the total. Alignment between the two sequences is straightforward over most of their length and provides an ideal basis for the design of chimeric proteins. ABC transporters are organized in characteristic structural domains (Croop, 1998), and chimeras were constructed along the lines of this modular architecture to identify the respective role of domains TMD2 and NBD2.

The three chimeras presented were fully functional and retained all of the properties common to SUR1 and SUR2A, including ATP sensitivity. Their responses to the cromakalim analog SR47063 suggest that the transmembrane region TMD2 of SUR is an essential determinant of the sensitivity to SR47063. The strongest evidence is that SUR1 acquired the SR47063 sensitivity of SUR2A when its TMD2 region was replaced by that of SUR2A (chimera Chim6). This evi-

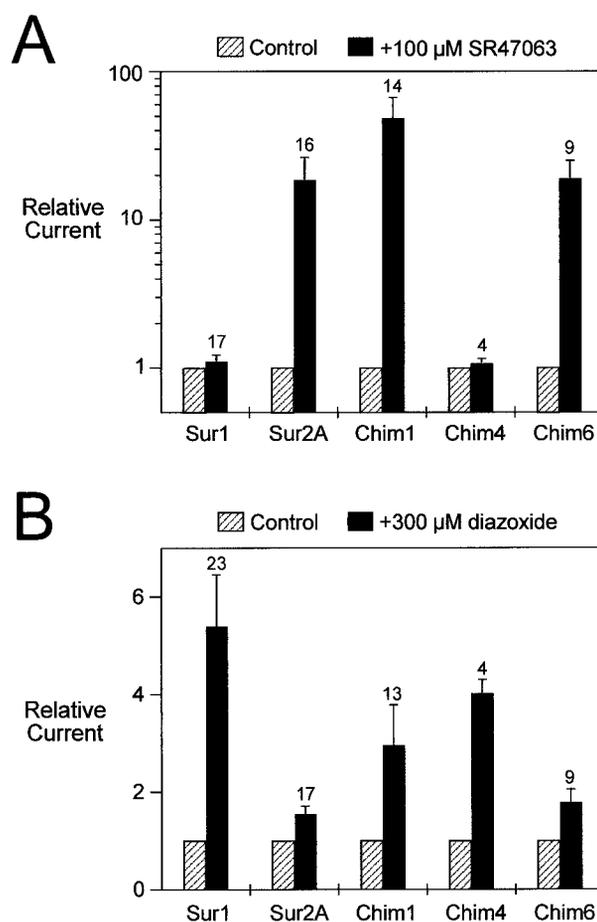
dence is corroborated by the behavior of the other chimeras, which shows that SR47063 sensitivity is associated with the presence of the TMD2 region of SUR2A. Thus, the TMD2 region could contain a KCO-binding site or an essential part of it. Alternately, it could just provide a link between KCO binding and channel opening. This latter possibility, which would imply that KCOs can bind equally well to SUR1 and SUR2A, is in contradiction with the much smaller binding affinity for SUR1 than SUR2A as estimated by Schwanstecher et al. (1998).

The TMD2 region that makes up a little less than one third of the SUR receptor is the region least conserved between SUR1 and SUR2, with 60% identities compared with more than 80% for the NBD1 and NBD2 domains. It contains four highly hydrophobic stretches of amino acids compatible with at least four and possibly six transmembrane helices (Tusnady et al., 1997). A direct involvement of such a region in the binding of KCOs would be consistent with the hydrophobic nature of KCOs, which could reach their target via the lipid bilayer as has been postulated for the substrates of another ABC transporters, the P-glycoprotein (Sharom, 1997).

Our data indicate that in the absence of  $Mg^{2+}$ , SR47063 was still able to produce activation of SUR2A/kir6.2 channels. Although the subunits of the skeletal muscle  $K_{ATP}$  channels have not been formally identified, these data are in



**Fig. 6.** Pharmacological regulation of chimeric  $K_{ATP}$  channels. A, responses to diazoxide ( $300 \mu M$ ) and SR47063 ( $100 \mu M$ ) of currents recorded at  $-50$  mV from an inside-out patch excised from an oocyte coinjected with Kir6.2 and Chim1. B, Idem with Chim4. C, Idem with Chim6. The differences in the on and off rates of the responses shown in each panel do not reflect different properties of the chimeras but rather reflect the differences in ease of solution exchange arising from patch-to-patch variations in the diffusional distance between patch and pipette tip.



**Fig. 7.** Effects of SR47063 and diazoxide on wild-type and chimeric  $K_{ATP}$  channels. A, normalized amplitude of currents measured at  $-50$  mV in the presence of  $100 \mu M$  ATP and  $1$  mM  $Mg^{2+}$  before (Control) and during the application of  $100 \mu M$  SR47063. Numbers above bars indicate the number of patches tested. B, Idem but with  $300 \mu M$  diazoxide.

agreement with our previous observations on native  $K_{ATP}$  channels from skeletal muscle showing little effect of  $Mg^{2+}$  on KCO activation (Forestier et al., 1996) and suggesting that KCOs can bind in the absence of both  $Mg^{2+}$  and nucleotides (Forestier et al., 1993). Without  $Mg^{2+}$ , SUR2A/kir6.2 activation was weaker and reversed much more rapidly on washout of the drug. This could possibly explain why binding of a tritiated KCO to native (Dickinson et al., 1997) or recombinant (Schwanstecher et al., 1998) channels could only be measured when hydrolyzable nucleotides and  $Mg^{2+}$  were present. Thus, nucleotide binding and hydrolysis by the NBDs would serve to modulate interaction of KCOs with the TMD2 region.

#### Role of Carboxyl-Terminal End in Diazoxide Action.

The role of the carboxyl-terminal extremity of SUR in diazoxide activation was anticipated in view of the functional differences between the two splice variants SUR2A and SUR2B, which, in the mouse, have only 28 nonidentical amino acids all within the last 42 amino acids. Because diazoxide activates SUR2B/Kir6.2 channels (Isomoto et al., 1996) but not SUR2A/Kir6.2 channels, elementary logic dictates that diazoxide sensitivity resides in the carboxyl-terminal end of SUR. Unfortunately, experimental evidence is at odds with this simple reasoning. The two chimeras Chim1 and Chim4 that have the carboxyl-terminal extremity of the diazoxide-insensitive SUR2A isoform were activated by diazoxide although not to the same degree as SUR1, and the chimera Chim6, which retained the SUR1 carboxyl terminus, was nearly insensitive to diazoxide. Therefore, it does appear that the carboxyl-terminal extremity is one among several determinants of diazoxide action. Indirect estimates of diazoxide binding affinity have shown that despite their functional differences, SUR1 and SUR2A have comparable affinities for diazoxide (Schwanstecher et al., 1998). The site of action of diazoxide would therefore be located within conserved sequence elements, and functional differences among isoforms would be due to variations in efficacy (i.e., in the structures linking channel opening to binding). The present observations do not permit an association of these structures to a specific domain but imply that they are distributed over the whole protein and that their functional role is governed by complex allosteric interactions. On the other hand, the nucleotide binding domains, the most conserved regions of the SUR isoforms, of which the integrity is indispensable for diazoxide activation (Gribble et al., 1997; Shyng et al., 1997), are more likely to be directly involved with the binding than with the efficacy of the opener.

**Conclusions.** Despite the therapeutic potential of KCOs, the molecular details of their mechanisms of action remain mysterious. We have demonstrated here by a chimeric approach that distinct structures of SUR mediate  $K_{ATP}$  channel activation by the openers diazoxide and cromakalim. If a single domain, the last transmembrane spanning region of SUR, was found to be fundamental for cromakalim action, functional determinants of diazoxide action appeared distributed over several domains, and not only over the carboxyl-terminal extremity as previously postulated (Isomoto et al., 1996). This constitutes a first step toward the precise determination of KCO interaction sites that should lead to a better understanding of the structure and mechanisms of SUR and other ABC transporters.

#### Acknowledgments

We are grateful to Dr. D. Logothetis (Mount Sinai Hospital, New York, NY) for providing vector pGEMHE, Dr. F. Pagès (Commissariat à l'Énergie Atomique, Grenoble, France) for vectors pGH2 and pGH3, Dr. S. Seino (Chiba University School of Medicine, Chiba, Japan) for mouse Kir6.2 and rat SUR2A, Dr. J. Bryan (Baylor College of Medicine, Houston, TX) for hamster SUR1, and Dr. P. Gautier (Sanofi Recherche, Montpellier, France) for SR 47063.

#### References

- Aguilar-Bryan L, Clement JP, Gonzalez G, Kunjilwar K, Babenko A and Bryan J (1998) Toward understanding the assembly and structure of K-ATP channels. *Physiol Rev* **78**:227–245.
- Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Wechsler SW, Clement JP, Boyd AE, Gonzalez G, Herrerasosa H, Nguy K, Bryan J and Nelson DA (1995) Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: A regulator of insulin secretion. *Science (Wash DC)* **268**:423–426.
- Ashcroft SJH and Ashcroft FM (1990) Properties and functions of ATP-sensitive K-channels. *Cell Signal* **2**:197–214.
- Clement JP, Kunjilwar K, Gonzalez G, Schwanstecher M, Panten U, Aguilar-Bryan L and Bryan J (1997) Association and stoichiometry of K-ATP channel subunits. *Neuron* **18**:827–838.
- Croop JM (1998) Evolutionary relationships among ABC transporters. *Methods Enzymol* **292**:101–116.
- Dickinson KEJ, Bryson CC, Cohen RB, Rogers L, Green DW and Atwal KS (1997) Nucleotide regulation and characteristics of potassium channel opener binding to skeletal muscle membranes. *Mol Pharmacol* **52**:473–481.
- Dunne MJ, Illot MC and Petersen OH (1987) Interaction of diazoxide, tolbutamide and  $ATP_4^-$  on nucleotide dependent potassium channels in an insulin-secreting cell line. *J Membr Biol* **99**:215–224.
- Fan Z and Makielski JC (1997) Anionic phospholipids activate ATP-sensitive potassium channels. *J Biol Chem* **272**:5388–5395.
- Findlay I and Faivre JF (1991) ATP-sensitive K channels in heart muscle: Spare channels. *FEBS Lett* **279**:95–97.
- Forestier C, Depresle Y and Vivaudou M (1993) Intracellular protons control the affinity of skeletal muscle ATP-sensitive  $K^+$  channels for potassium-channel-openers. *FEBS Lett* **325**:276–280.
- Forestier C, Pierrard J and Vivaudou M (1996) Mechanism of action of K channel openers on skeletal muscle K-ATP channels: Interactions with nucleotides and protons. *J Gen Physiol* **107**:489–502.
- Forestier C and Vivaudou M (1993) Modulation by  $Mg^{2+}$  and ADP of ATP-sensitive potassium channels in frog skeletal muscle. *J Membr Biol* **132**:87–94.
- Gopalakrishnan M, Janis RA and Triggle DJ (1993) ATP-sensitive  $K^+$  channels: Pharmacologic properties, regulation, and therapeutic potential. *Drug Dev Res* **28**:95–127.
- Gribble FM, Tucker SJ and Ashcroft FM (1997) The essential role of the Walker A motifs of SUR1 in K-ATP channel activation by Mg-ADP and diazoxide. *EMBO J* **16**:1145–1152.
- Gribble FM, Tucker SJ, Haug T and Ashcroft FM (1998a) MgATP activates the beta cell K-ATP channel by interaction with its SUR1 subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:7185–7190.
- Gribble FM, Tucker SJ, Seino S and Ashcroft FM (1998b) Tissue specificity of sulfonylureas: Studies on cloned cardiac and beta-cell K-ATP channels. *Diabetes Care* **47**:1412–1418.
- Hamil OP, Marty A, Neher E, Sakmann B and Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pfluegers Arch* **391**:85–100.
- Horton RM, Hunt HD, Ho SN, Pullen JK and Pease LR (1989) Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: Gene splicing by overlap extension. *Gene* **77**:61–68.
- Inagaki N, Gono T, Clement JP, Namba N, Inazawa J, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L, Seino S and Bryan J (1995) Reconstitution of I-KATP: An inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science (Wash DC)* **270**:1166–1170.
- Inagaki N, Gono T, Clement JP, Wang CZ, Aguilar-Bryan L, Bryan J and Seino S (1996) A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive  $K^+$  channels. *Neuron* **16**:1011–1017.
- Inagaki N, Gono T and Seino S (1997) Subunit stoichiometry of the pancreatic beta-cell ATP-sensitive  $K^+$  channel. *FEBS Lett* **409**:232–236.
- Isomoto S, Kondo C, Yamada M, Matsumoto S, Higashiguchi O, Horio Y, Matsuzawa Y and Kurachi Y (1996) A novel sulfonylurea receptor forms with BIR (Kir6.2) a smooth muscle type ATP-sensitive  $K^+$  channel. *J Biol Chem* **271**:24321–24324.
- Isomoto S and Kurachi Y (1997) Function, regulation, pharmacology, and molecular structure of ATP-sensitive  $K^+$  channels in the cardiovascular system. *J Cardiovasc Electrophysiol* **8**:1431–1446.
- Jacquet H, D'hahan N, Moreau C and Vivaudou M (1999) A transmembrane domain of the sulfonylurea receptor mediates activation of K-ATP channels by K-channel-openers. *Biophys J* **76**:A413.
- Kozlowski RZ and Ashford ML (1992) Nucleotide-dependent activation of  $K_{ATP}$  channels by diazoxide in CRI-G1 insulin-secreting cells. *Br J Pharmacol* **107**:34–43.
- Larsson O, Ammalu C, Bokvist K, Fredholm B and Rorsman P (1993) Stimulation of the  $K_{ATP}$  channel by ADP and diazoxide requires nucleotide hydrolysis in mouse pancreatic beta-cells. *J Physiol (Lond)* **463**:349–365.
- Lawson K (1996) Is there a therapeutic future for 'potassium channel openers'? *Clin Sci* **91**:651–663.

- Liman ER, Tytgat J and Hess P (1992) Subunit stoichiometry of a mammalian  $K^+$  channel determined by construction of multimeric cDNAs. *Neuron* **9**:861–871.
- Lorenz E, Alekseev AE, Krapivinsky GB, Carrasco AJ, Clapham DE and Terzic A (1998) Evidence for direct physical association between a  $K^+$  channel (Kir6.2) and an ATP-binding cassette protein (SUR1) which affects cellular distribution and kinetic behavior of an ATP-sensitive  $K^+$  channel. *Mol Cell Biol* **18**:1652–1659.
- Okuyama Y, Yamada M, Kondo C, Satoh E, Isomoto S, Shindo T, Horio Y, Kitakaze M, Hori M and Kurachi Y (1998) The effects of nucleotides and potassium channel openers on the SUR2A/Kir6.2 complex  $K^+$  channel expressed in a mammalian cell line, HEK293T cells. *Pfluegers Arch* **435**:595–603.
- Schwanstecher M, Sieverding C, Dorschner H, Gross I, Aguilar-Bryan L, Schwanstecher C and Bryan J (1998) Potassium channel openers require ATP to bind to and act through sulfonylurea receptors. *EMBO J* **17**:5529–5535.
- Sharom FJ (1997) The P-glycoprotein efflux pump: How does it transport drugs? *J Membr Biol* **160**:161–175.
- Shyng SL, Ferrigni T and Nichols CG (1997) Regulation of K-ATP channel activity by diazoxide and MgADP: Distinct functions of the two nucleotide binding folds of the sulfonylurea receptor. *J Gen Physiol* **110**:643–654.
- Shyng SL and Nichols CG (1997) Octameric stoichiometry of the K-ATP channel complex. *J Gen Physiol* **110**:655–664.
- Tucker SJ, Gribble FM, Zhao C, Trapp S and Ashcroft FM (1997) Truncation of Kir6.2 produces ATP-sensitive  $K^+$  channels in the absence of the sulfonylurea receptor. *Nature (Lond)* **387**:179–183.
- Tusnady GE, Bakos E, Váradi A and Sarkadi B (1997) Membrane topology distinguishes a subfamily of the ATP-binding cassette (ABC) transporters. *FEBS Lett* **402**:1–3.
- Vivaudou M and Forestier C (1995) Modification by protons of frog skeletal muscle  $K_{ATP}$  channels: Effects on ion conduction and nucleotide inhibition. *J Physiol (Lond)* **486**:629–645.
- Walker JE, Saraste M, Runswick MJ and Gay NJ (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* **1**:945–951.

---

**Send reprint requests to:** Dr. Michel Vivaudou, Commissariat à l'Energie Atomique, Département de Biologie Moléculaire et Structurale, Biophysique Moléculaire et Cellulaire, 17 rue des Martyrs, 38054, Grenoble, France. E-mail: vivaudou@cea.fr

---

A partir de ces premiers résultats très encourageants, de nouvelles protéines chimériques ont été élaborées pour valider dans un premier temps, les résultats précédents selon lesquels l'action du SR47063 transite par le TMD2 de SUR2A (*Figure 1* ; Moreau et al., 2000), puis pour affiner la localisation du site de fixation en restreignant la participation des domaines de SUR2A dans les protéines chimériques (*Figure 2A* ; Moreau et al., 2000). Les mesures démontrent que les hélices transmembranaires 12, 13, 14 (respectivement la 1<sup>ère</sup>, 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> hélice du TMD2) ne sont pas suffisantes pour conférer la sensibilité du récepteur des sulfonylurées (chimères C1-C3) au SR47063. Par contre, toutes les chimères contenant la dernière hélice transmembranaire de SUR2A (B1, B3, B4, B6, B7) sont sensibles à l'ouvreur, démontrant que cette hélice contient des résidus importants pour l'action du SR47063.

L'alignement des séquences de l'hélice 17 de SUR1 et de SUR2A, révèle que sur les 20 résidus prédits de ces hélices, seuls 5 sont différents entre les deux isoformes, et pour être plus précis, 3 sont homologues (SUR1: Val1291, Ser1292, Met1298 ; SUR2A: Ile1254, Thr1255, Val1261) et 2 différents (SUR1: Thr1286, Met1290 ; SUR2A: Leu1249, Thr1253) (*Figure 3A* ; Moreau et al., 2000). Si au lieu d'incorporer l'hélice 17 complète de SUR2A dans SUR1, nous n'y introduisons que 3 des 5 résidus non homologues (chimère B12), les canaux chimériques sont encore sensibles au SR47063. Plus étonnant encore, un seul résidu de SUR2A incorporé dans SUR1 suffit à conférer une certaine sensibilité à l'ouvreur, ce résidu étant soit la leucine en position 1286 [SUR1(T1286L)], soit la thréonine en position 1290 [SUR1(L1290T)] (*Figure 3*, Moreau et al., 2000). En plus d'être suffisants, ces résidus sont également nécessaires pour l'action du SR47063 sur SUR2A comme le démontrent la chimère D1 et le double mutant SUR2A (L1249T, T1253M) (*Figure 4A*, Moreau et al., 2000) devenus insensibles à l'ouvreur.

Ainsi la leucine 1249 et la thréonine 1253 de SUR2A sont des déterminants nécessaires et suffisants pour l'action, non seulement du SR47063, mais aussi des ouvreurs antihypertensifs testés: le pinacidil (P1075) et le rilmakalim (HOE234) (*Figure 5A,B,C* ; Moreau et al., 2000). Cependant, les deux résidus n'induisent pas de réponses équivalentes aux ouvreurs, puisque le mutant SUR1(L1249T) est considérablement moins sensible, voir même insensible au P1075 et au HOE234.

## The molecular basis of the specificity of action of $K_{ATP}$ channel openers

Christophe Moreau, H el ene Jacquet, Anne-Lise Prost, Nathalie D'ahan and Michel Vivaudou<sup>1</sup>

CEA, DBMS, Biophysique Moléculaire et Cellulaire (UMR CNRS/UJF/CEA 5090), 17 Rue des Martyrs, 38054 Grenoble, France

<sup>1</sup>Corresponding author  
e-mail: vivaudou@cea.fr

C. Moreau and H. Jacquet contributed equally to this work

$K_{ATP}$  channels incorporate a regulatory subunit of the ATP-binding cassette (ABC) transporter family, the sulfonylurea receptor (SUR), which defines their pharmacology. The therapeutically important  $K^+$  channel openers (e.g. pinacidil, cromakalim, nicorandil) act specifically on the SUR2 muscle isoforms but, except for diazoxide, remain ineffective on the SUR1 neuronal/pancreatic isoform. This SUR1/2 dichotomy underpinned a chimeric strategy designed to identify the structural determinants of opener action, which led to a minimal set of two residues within the last transmembrane helix of SUR. Transfer of either residue from SUR2A to SUR1 conferred opener sensitivity to SUR1, while the reverse operation abolished SUR2A sensitivity. It is therefore likely that these residues form part of the site of interaction of openers with the channel. Thus, openers would target a region that, in other ABC transporters, is known to be tightly involved with the binding of substrates and other ligands. This first glimpse of the site of action of pharmacological openers should permit rapid progress towards understanding the structural determinants of their affinity and specificity.

**Keywords:** ABC transporter/ATP-sensitive K channel/cromakalim/pinacidil/sulfonylurea receptor

### Introduction

ATP-sensitive  $K^+$  ( $K_{ATP}$ ) channels are widely distributed among most types of excitable cells, where their primary function is to couple membrane excitability to cellular energy levels (Ashcroft and Ashcroft, 1990). In pancreatic  $\beta$ -cells, they serve as metabolic sensors in the cascade linking insulin secretion to hyperglycemia, and in muscle and neuronal cells they are thought to serve a protective role against ischemic insults.  $K_{ATP}$  channels are the main targets of  $K^+$  channel openers, a chemically diverse group of molecules that includes cromakalim, pinacidil, nicorandil and diazoxide (Gopalakrishnan *et al.*, 1993). Openers are of considerable therapeutic interest as they constitute efficient tools to adjust down cell excitability

and they are beneficial in conditions such as hypertension and ischemia (Lawson, 1996). Clinical use of openers is impaired, however, by insufficient tissue specificity and somewhat low affinity, a situation unlikely to improve without a better understanding of the sites and mechanisms of action of these pharmacological agents.

The ultrastructure of the  $K_{ATP}$  channel is unique among ion channels as it is a complex of two proteins: the sulfonylurea receptor (SUR) (Aguilar-Bryan *et al.*, 1995), which is a member of the ABC (ATP-binding cassette) transporter family, and a smaller protein Kir6.2 (Inagaki *et al.*, 1995), which belongs to the inward rectifier  $K^+$  channel family. Four Kir6.2 subunits assemble to form a  $K^+$ -selective pore, which is constitutively associated to four SUR subunits (Clement *et al.*, 1997; Inagaki *et al.*, 1997; Shyng and Nichols, 1997; Zerangue *et al.*, 1999). The variable tissue-specific properties, particularly the response to openers, of  $K_{ATP}$  channels arise from the identity of the SUR isoform expressed in that tissue. Channels containing isoform SUR1, which is found in neuronal cells and pancreatic  $\beta$ -cells, are blocked with high affinity by sulfonylureas (Gribble *et al.*, 1998) and can be activated by only one opener, diazoxide (D'ahan *et al.*, 1999b). Coded by a distinct gene, the muscle isoforms SUR2, SUR2A predominant in cardiac and skeletal muscles and its splice variant SUR2B found in smooth muscle, impart activation by the full range of  $K^+$  channel openers (Inagaki *et al.*, 1995, 1996; Isomoto *et al.*, 1996; Babenko *et al.*, 1998; D'ahan *et al.*, 1999a).

Recently, several groups have taken advantage of the differential sensitivity to openers of the SUR1 and SUR2A isoforms, to analyze chimeric constructs in order to identify the site of action of openers on SUR. We first used this approach to restrict the cromakalim site to the third transmembrane domain (TMD2; see Figure 1A for terminology) of SUR (D'ahan *et al.*, 1999a), a finding later confirmed by Babenko *et al.* (2000). Within this domain, two separate regions, a short 29-residue segment connecting helices H13 and H14 and a longer 103-residue segment encompassing H16, H17 and part of NBD2 (Figure 1A), were identified as essential for binding of the pinacidil analog P1075 (Uhde *et al.*, 1999).

Using SUR1–SUR2A chimeras and point mutants expressed and characterized in *Xenopus* oocytes by patch-clamp techniques, we narrowed the search down to two amino acid residues (L1249/T1253 in SUR2A and T1286/M1290 in SUR1) within the last helix of TMD2. Our results, which imply a close association between these residues and the cromakalim binding site, provide the first close-up view of the molecular mechanism of action of  $K^+$  channel openers.

A preliminary account of this work has been published in abstract form (Jacquet *et al.*, 2000).

## Results

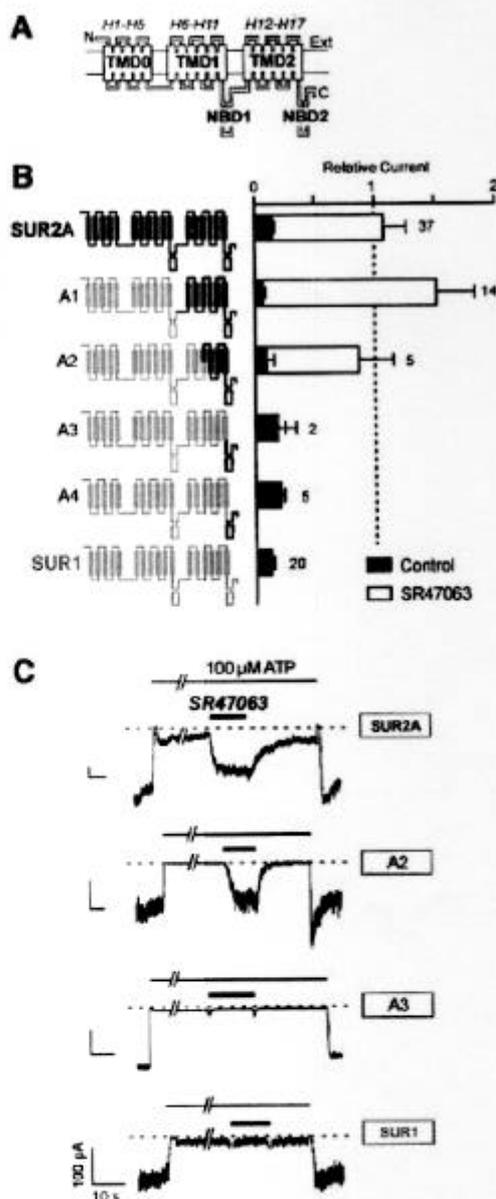
In order to identify the elements of the primary sequence of the SUR that are responsible for the activation of  $K_{ATP}$  channels by  $K^+$  channel openers, we have pursued an approach based on the construction of chimeras between SUR isoforms having easily distinguishable opener sensitivity. We used the pancreatic isoform SUR1 and the cardiac muscle isoform SUR2A with SR47063, an analog of cromakalim, as a test substance. Although SUR1 and SUR2A display a high degree of homology in their primary sequence with 67% identical amino acids, they possess ~300 non-matching amino acids distributed throughout their sequences. Our strategy aimed at identifying which of these mismatches were responsible for the observed phenotypic differences in terms of opener pharmacology.

Our standard assay, illustrated in Figure 1C, consisted of co-expressing wild-type or modified SURs with Kir6.2 in *Xenopus* oocytes, monitoring the activity of the resulting  $K_{ATP}$  channels by the patch-clamp technique in the inside-out configuration, and measuring the change in activity produced by a saturating dose (100  $\mu$ M) of SR47063. In the presence of a concentration of ATP (100  $\mu$ M) sufficient in most patches to produce an 80% channel inhibition, such a dose of opener robustly activated SUR2A/Kir6.2 channels but had no discernible effects on SUR1/Kir6.2 channels. As demonstrated in the following, the same rapid and simple single-dose assay proved appropriate and sufficient, since practically all of our constructs gave clear-cut responses to this simple assay and could be unambiguously classified as having a SUR2A phenotype ( $\geq 3$ -fold increase in current) or a SUR1 phenotype ( $< 20\%$  increase in current).

Initially, we replaced progressively longer portions of the N-terminus of SUR2A with the corresponding segments of SUR1. The first chimera, A1, which contains only the last transmembrane domain (TMD2) and nucleotide binding domain (NBD2) of SUR2A (see Figure 1A for terminology), was found to retain full sensitivity to SR47063 (Figure 1B). While the lack of response of chimeras A3 and A4 dismisses NBD2 as non-essential, the strong response of chimera A2 reduces the candidate region to a 149-residue fragment of TMD2 going from SUR2A residues L1119 to D1267.

New chimeras consisting of SUR1 containing only fragments of domain TMD2 from SUR2A were constructed and tested (Figure 2). Chimera B1, which possesses the entire domain TMD2 from SUR2A, was responsive to opener as expected. Chimeras C1, C2 and C3 showed no significant activation by SR47063, confirming that the N-terminal half of TMD2 is not an essential determinant of opener sensitivity. Chimeras B3, B4, B6 and B7 demonstrate that, within the C-terminal half of TMD2, the last helix H17 (Figure 1A) is crucial. When H17 from SUR2A is transplanted into SUR1, the resulting construct B7 acquires the opener responsiveness of SUR2A.

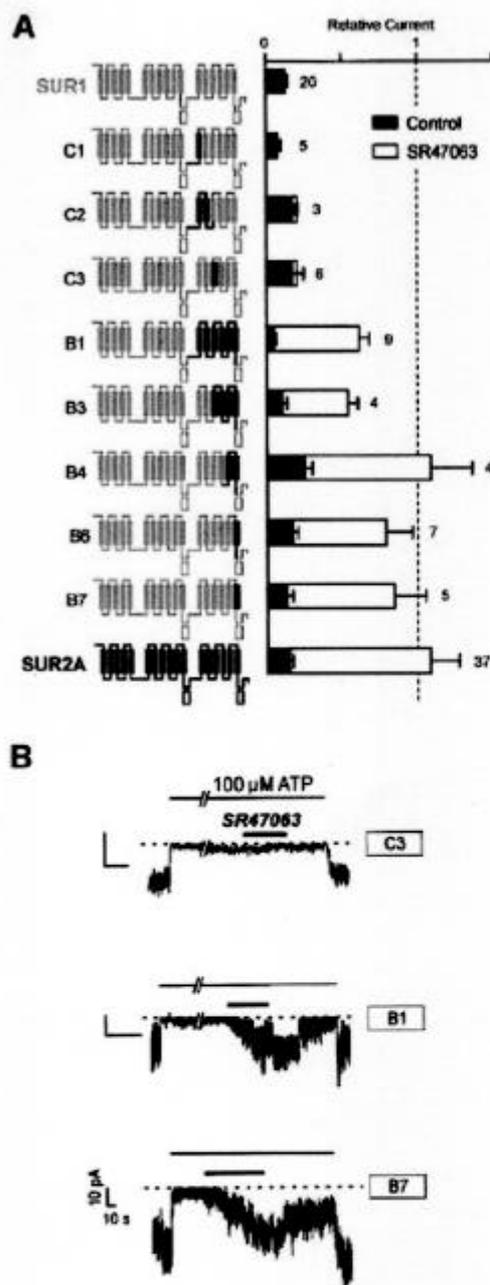
Helix H17 is rather well conserved between SUR1 and SUR2A, and possesses only five non-identical residues among 20: these residues are T1286, M1290, V1291, S1292 and M1298 in SUR1, and L1249, T1253, I1254, T1255 and V1261 in SUR2A. The respective ability of



**Fig. 1.** The C-terminal half of the second transmembrane domain of SUR2A is an essential determinant of the response of chimeric  $K_{ATP}$  channels to the cromakalim analog SR47063. (A) Hypothetical topology of the SUR. SUR is represented as a modular transmembrane protein with an extracellular N-terminal and an intracellular C-terminal domain, three transmembrane domains, TMD0, TMD1 and TMD2, and two cytoplasmic nucleotide-binding domains, NBD1 and NBD2. Rectangular boxes stand for postulated transmembrane helices (Tusnády *et al.*, 1997) designated here H1–H17. (B) Effects of SR47063 on  $K_{ATP}$  currents recorded in inside-out patches excised from oocytes co-expressing Kir6.2 and wild-type or chimeric SURs. Chimeras are schematized to the left with SUR1 and SUR2A sequence elements drawn in gray and black, respectively. Average currents in 100  $\mu$ M ATP (relative to current measured in the absence of ATP) measured before (Control) and during application of 100  $\mu$ M SR47063 are shown on the right. Numbers above bars indicate the number of patches included in the average. (C) Representative patch-clamp records illustrating the responses of specified wild-type and chimeric channels and the protocols used to test them.

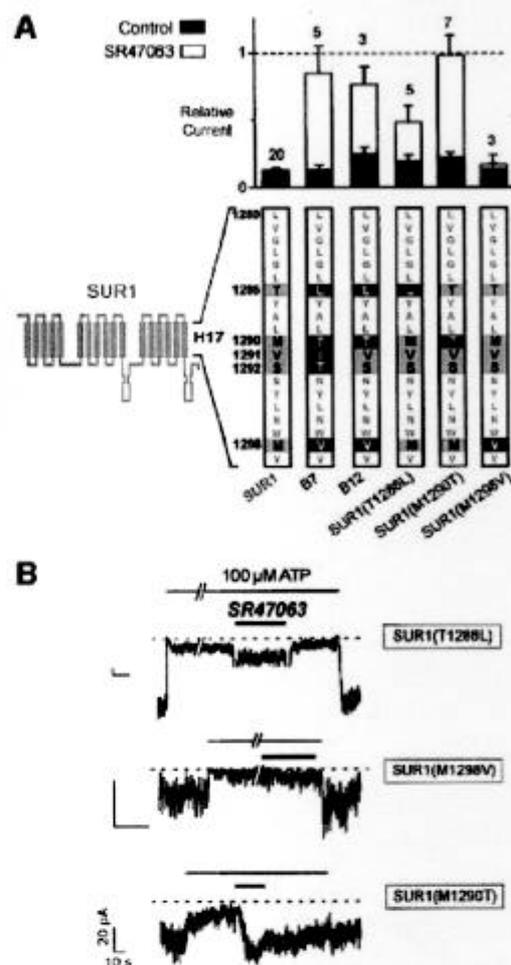
these residues to support opener activation was investigated by site-directed mutagenesis.

As shown in Figure 3, chimera B7 is equivalent to SUR1 with the five mutations T1286L, M1290T, V1291I,



**Fig. 2.** Central role of the last helix of SUR (H17) in  $K_{ATP}$  channel activation by SR47063. (A) Effects of SR47063 on  $K_{ATP}$  currents recorded from oocytes co-expressing Kir6.2 and wild-type or SUR1-based chimeras incorporating progressively shorter fragments of domain TMD2 of SUR2A. (B) Representative current records showing the effects of SR47063 on the indicated chimeras.

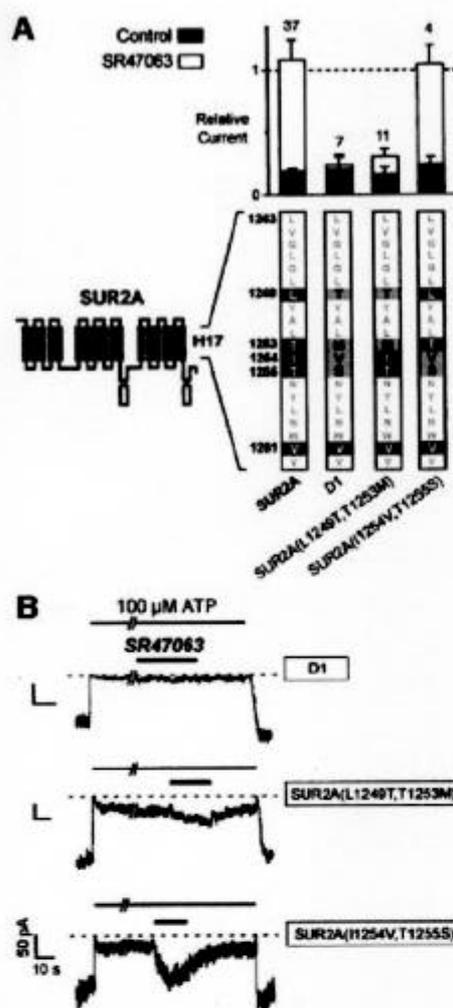
S1292T and M1298V. The two conservative mutations V1291I and S1292T appeared non-essential since chimera B12, which retains only the three non-conservative mutations T1286L, M1290T and M1298V, was still vigorously activated by the opener. When these mutations were examined individually, only mutation M1290T was able to confer to SUR1 the ability to be activated by SR47063 as efficiently as SUR2A. Mutation T1286L rendered SUR1 sensitive to SR47063, but activation was noticeably weaker. Mutation M1298V was the least effective and yielded only marginal or no increases in current when probed with opener.



**Fig. 3.** Single-residue substitutions within helix H17 confer SR47063 sensitivity to SUR1. (A) Effects of SR47063 on  $K_{ATP}$  currents recorded from oocytes co-expressing Kir6.2 and SUR1 subunits carrying mutations within helix H17. The sequence of helix H17 is shown at the bottom with residues common to SUR1 and SUR2A shown as gray characters on a white background, residues specific to SUR1 as black on gray, and residues mutated to their SUR2A counterparts as white on black. (B) Representative current records showing the effects of SR47063 on single-point mutants.

These results suggest that SUR2A residues T1253 and, to a lesser extent, L1249 are sufficient to confer opener sensitivity to SUR1. Whether these residues are necessary was addressed by the experiments described in Figure 4 where, logically, we examined the effects of their substitutions in the context of SUR2A. Construct D1, which is SUR2A with most of helix H17 from SUR1, did not respond to opener SR47063, confirming the major role of this helix. Within helix H17, L1249 and T1253 were most closely linked to opener activation since mutant SUR2A(L1249T,T1253M) became almost immune to activation, but mutant SUR2A(I1254V,T1255S) kept a wild-type phenotype. The behavior of the SUR2A mutants is therefore fully consistent with that of the converse SUR1 mutants.

Experiments described so far applied to the single opener SR47063 and results would not necessarily apply to other openers of different chemical structures. We conducted experiments to assess the role of T1253 and L1249 in the response to two other openers: the pinacidil



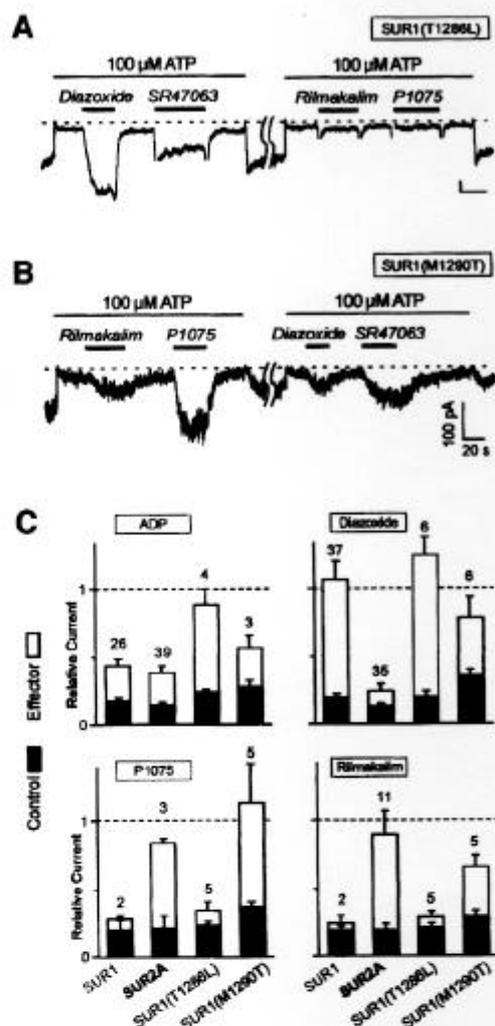
**Fig. 4.** Single-residue substitutions within helix H17 abolish the effects of SR47063 on SUR2A. (A) Effects of SR47063 on  $K_{ATP}$  currents recorded from oocytes co-expressing Kir6.2 and SUR2A subunits carrying mutations within helix H17. The sequence of helix H17 is shown at the bottom with residues common to SUR1 and SUR2A shown as gray characters on a white background, residues specific to SUR2A as white on black, and residues mutated to their SUR1 counterparts as black on gray. (B) Representative current records illustrating the effects of SR47063 on the mutants of (A).

analog P1075 and rilmakalim (HOE234), a bulkier derivative of cromakalim possessing an added phenylsulfonfyl group (Terzic *et al.*, 1994). As shown in Figure 5, transfer of T1253 from SUR2A to SUR1 to yield mutant SUR1(M1290T) conferred sensitivity not only to SR47063 but also to rilmakalim and P1075. This was not true of mutation T1286L, which did not make SUR1 any more sensitive to rilmakalim and P1075.

These data concur to designate the Thr residue at position 1253 of SUR2A as a most critical determinant of  $K_{ATP}$  channel activation. We therefore proceeded to investigate the role of this residue in the response of  $K_{ATP}$  channels to two other singular activators: ADP, the physiological opener of  $K_{ATP}$  channels (Nichols *et al.*, 1996), and diazoxide, the only synthetic opener acting on SUR1 (Figure 5C).

ADP, which activates SUR1 and SUR2A channels to the same extent, also activated both mutants. Although

## Two residues control $K_{ATP}$ channel opener action



**Fig. 5.** Comparative effects of different classes of  $K^+$  channel openers on single-point SUR1 mutants. (A) Representative current trace illustrating the effects in the same membrane patch of diazoxide (300  $\mu$ M), SR47063 (100  $\mu$ M), rilmakalim (HOE234; 10  $\mu$ M) and the pinacidil analog P1075 (100  $\mu$ M) on channels formed of SUR1(T1286L) and Kir6.2. (B) The same as (A) for SUR1(M1290T). (C) Average effects of ADP (100  $\mu$ M), diazoxide (300  $\mu$ M), SR47063 (100  $\mu$ M), rilmakalim (10  $\mu$ M) and the pinacidil analog P1075 (100  $\mu$ M) on  $K_{ATP}$  currents recorded in 100  $\mu$ M ATP from oocytes co-expressing Kir6.2 and wild-type or mutant SURs.

ADP responses are notably variable from patch to patch and even in the same patch (in our hands, they tend to fade away with time after patch excision), it appears that mutant SUR1(T1286L) was more responsive than wild-type SUR and the SUR1(M1290T) mutant.

Diazoxide is able to activate SUR2A channels provided sufficient internal ADP is present (D'haan *et al.*, 1999b). In our conditions, with no added ADP, only SUR1 channels are strongly activated by diazoxide, whereas SUR2A channels are not. Mutations T1286L and M1290T had little effect on the diazoxide responsiveness of SUR1, in sharp contrast to the dramatic effects of these mutations on the responsiveness of SUR1 to other openers. This observation agrees with our previous conclusion that separate regions mediate the effects of diazoxide and that of other openers (D'haan *et al.*, 1999a). Nonetheless,

mutation M1290T caused a reduction in the activation by diazoxide while mutation T1286L caused a slight increase.

## Discussion

This study has identified two SUR residues that are intimately involved with the activation of  $K_{ATP}$  channels by  $K^+$  channel openers and could possibly form part of a binding pocket able to accommodate openers of different chemical classes. These residues, which we shall call I and II, are located within the last transmembrane helix of SUR at positions 1249 and 1253 of SUR2A and at the aligned positions 1286 and 1290 of SUR1. Residues I and II are Leu and Thr in opener-sensitive isoforms SUR2A and SUR2B and Thr and Met in opener-insensitive SUR1, respectively.

### Identification of residues responsible for the differential sensitivity of SUR1 and SUR2A to SR47063

The critical role of residues I and II was discovered by following a systematic chimeric strategy destined to isolate the elements of the primary sequence of SUR2A capable of conferring opener sensitivity when substituted in SUR1. Matched chimeras incorporating progressively shorter fragments of SUR2A in a SUR1 background led to the remarkable finding that the opener phenotype of SUR2A could be carried over to SUR1 through single-residue substitutions. Thus, single-point SUR1 mutants with residues I or II from SUR2A acquired a responsiveness to the cromakalim analog, SR47063, which was totally absent from their SUR1 parents. Conversely, the transfer of both residues I and II from SUR1 in SUR2A did not completely obliterate the responses to SR47063, suggesting that other determinants remained, but the residual effect was extremely weak, implying that these determinants were of minor importance compared with residues I and II. While we are aware of the pitfalls of overinterpreting mutagenesis results, the combination of experiments showing both gain-of-function in the SUR1 context and loss-of-function in the SUR2A context argues strongly in favor of a direct involvement of residues I and II in the binding and effect of cromakalim.

### Structural implications: binding and specificity of openers

Since our testing assay is purely functional, residues I and II could intervene either at the binding step or at the transducing step linking binding to channel activation. The second hypothesis is highly improbable given that biochemical binding studies indicate that wild-type SUR1 does not bind levromakalim [the active isomer of cromakalim resembling SR47063 in its structure and efficacy (Forestier *et al.*, 1996)] to any measurable extent at the concentrations we have used (Schwanstecher *et al.*, 1998). If substitutions of residues I or II alter the binding of openers, one can not jump directly to the conclusion that they line the binding site. These mutations could uncover a pre-existing binding site through long-range allosteric effects. Such a possibility can not be formally discarded either with our functional experiments or with ligand binding experiments (Colquhoun, 1998). Nonetheless, we believe that its probability is low here for several reasons:

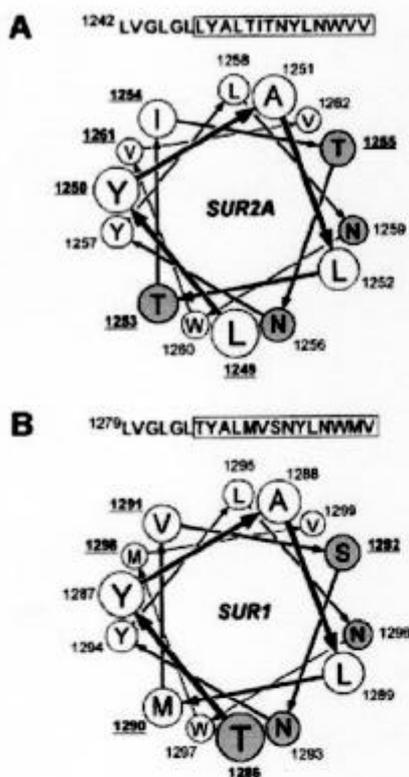
(i) it would entail a complex structural rearrangement of SUR, whereas residues I and II are located in the middle of a stable structure, a predicted transmembrane helix that is highly conserved in SUR1 and SUR2; (ii) it would require that SUR1 and SUR2A exist in well defined, distinct conformations with residues I or II acting as switches. If this were the case, it would have been extremely difficult to reach the consistency of our results with numerous chimeric constructs of unpredictable intermediate conformations; and (iii) finally, an allosteric effect of mutations could not easily account for the facts that substitution of residue II conferred sensitivity to three distinct openers to SUR1 but substitution of residue I made SUR1 sensitive solely to SR47063 (Figure 5).

We therefore feel that the most appropriate interpretation of our results is that residues I and II form part of the binding site for openers. These residues are one  $\alpha$ -helix turn away from each other and are therefore positioned next to each other on the same hydrophilic face of amphipathic helix H17 (Figure 6). The three other residues of H17 that differ between SUR1 and SUR2A (I254, T1255 and V1261 of SUR2A, and V1291, S1292 and M1298 of SUR1) are predicted to lie on the opposite face of the helix and, fittingly, their modifications did not perturb the opener phenotypes of either SUR1 or SUR2A.

If transfer of residue I of SUR2A to SUR1 (i.e. T1286L) conferred only weak sensitivity to SR47063 and none to P1075 and rilmakalim, transfer of residue II (M1290T) gave SUR1 the complete opener phenotype of SUR2A. These observations indicate that openers of different chemical structures do target the same site. They also suggest that Thr1253 has a central role in the SUR2A-opener interaction and that the other residues crucial to that interaction are shared by the two SUR isoforms. These other residues could very well include any of the three adjacent aromatic residues, Tyr1250, Tyr1257 and Trp1260 in SUR2A (Figure 6), which could interact favorably with the hydrophobic rings present in all  $K^+$  channel openers. Such weak interactions could contribute to the broad opener specificity of SUR2A (Pawagi *et al.*, 1994). Further substitutions of residue II will have to be evaluated to establish whether hydrogen-bonding capacity or compactness is the property of Thr that makes it superior to Met in favoring ligand binding, and whether the ligand interacts physically with this residue.

### Interactions with other regions of SUR

Our experiments were conducted with the cardiac isoform of SUR2: SUR2A. The smooth muscle isoform, SUR2B, responds to the same openers but with a significantly higher affinity (Schwanstecher *et al.*, 1998; Hambrook *et al.*, 1999). Since SUR2B is identical to SUR2A except for 28 residues at the C-terminal end (Isomoto *et al.*, 1996), one could envisage that opener affinity is modulated by direct interactions between the C-terminal extremity and the neighboring helix, H17. Our results could serve as a seed for experiments designed to address this possibility and further our knowledge of the topology of SUR and other similar ABC transporters. Another region to investigate is the loop connecting helices H13 and H14 (T1059-L1087) in TMD2 of SUR2. Although we did not analyze this region in detail with our simple assay, its modulatory role was uncovered by Uhde *et al.* (1999),



**Fig. 6.** Helical wheel projections of the last transmembrane helix H17 of SUR2A (A) and SUR1 (B). The helix is viewed from the extracellular side or the N-terminal end. Hydrophobic residues are represented as white circles and polar residues are shaded in gray. Numbers indicate residue positions in the sequence of the protein. Underlined numbers point out residues that are different in SUR1 and SUR2A. The N-terminal hydrophobic residues LVGLGL, identical in SUR1 and SUR2A, have been omitted for clarity.

who found it to be critical for maintaining high-affinity binding of P1075 to SUR2B.

We did not address here the role of nucleotides in modulating opener action. ATP and ADP, acting primarily on NBD1 and NBD2, respectively, are important regulators of opener binding and effect (Dickinson *et al.*, 1997; Gribble *et al.*, 1997; Shyng *et al.*, 1997; Schwanstecher *et al.*, 1998; D'hahan *et al.*, 1999b) and are themselves regulated by openers (Bienengraeber *et al.*, 2000). It has been proposed that the different opener phenotypes of SUR isoforms could be due to their different nucleotide-binding properties as measured by photoaffinity labeling (Matsuo *et al.*, 2000). That the responses to openers of SUR2A and SUR1(M1290T) were similar proves that, within the limits of our coarse examination, opener responsiveness is not critically associated with the specific properties of the nucleotide-binding domains. A more detailed study is warranted, however, and the availability of SUR1 single-point mutants sensitive to openers could be a useful tool in further investigations of this aspect of SUR pharmacology.

#### Openers as ABC transporter substrates

Recent work by Bienengraeber *et al.* (2000) has provided evidence that SUR possesses detectable intrinsic ATPase activity and that openers increase that activity. If and how

this relates to activation of  $K_{ATP}$  channels remain to be formally established. However, this observation suggests that openers display the behavior expected of ABC transporter substrates. In that respect, the discovery of helix H17 as part of the opener site is significant since in the most studied ABC transporter, P-glycoprotein, the matching helix H12 also appears to be crucial to substrate binding. By analyzing cross-linking experiments with a thiol-reactive substrate, Loo and Clarke (1997) identified several residues of H12 of P-glycoprotein within reach of the bound substrate. In spite of poor homology between P-glycoprotein and SUR, primary sequence alignment (ClustalW1.7 program; Thompson *et al.*, 1994) places these residues within one position or one helix turn of residues I and II of SUR. This underscores the relevance of this helix in ligand binding and raises the hypothesis that openers could act by occupying the substrate site of SUR, a site that could be an evolutionary remnant or the target of a hitherto unknown endogenous substance. Considering such a hypothesis, it would be tempting to speculate that the same mechanisms underlie the ability of SUR to recognize opener molecules of varied structures and the broad substrate specificity of the multidrug resistance transporters, P-glycoprotein (Ueda *et al.*, 1997) and the SUR homolog MRP (Borst *et al.*, 1999).

To our knowledge, the only other ABC transporter shown to interact with  $K^+$  channel openers is CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator). CFTR possesses intrinsic chloride channel activity, which is blocked by cromakalim (Sheppard and Welsh, 1992). Given the nearly 30% overall amino acid identity and 50% homology over helix H17 between SUR and CFTR, it might be worth looking at this last helix as a pharmacologically relevant region of CFTR.

#### Conclusions

We have demonstrated here that the differential responsiveness of  $K_{ATP}$  channel isoforms to openers arises from amino acid differences at two positions in the last transmembrane helix of SUR. Evidence suggests that these residues belong to a site accessible to openers of distinct chemical structures, a site that could resemble the substrate-binding site of other ABC transporters. Although the mechanism linking binding to channel opening remains to be elucidated, the discovery of the first piece of the puzzle provides a starting point toward assembling the full picture.

#### Materials and methods

##### Molecular biology

Mouse Kir6.2 (Inagaki *et al.*, 1995; DDBJ/EMBL/GenBank accession No. D50581), hamster SUR1 (Aguilar-Bryan *et al.*, 1995; DDBJ/EMBL/GenBank accession No. L40623) and rat SUR2A (Inagaki *et al.*, 1996; DDBJ/EMBL/GenBank accession No. D83598) were subcloned in the *Xenopus* oocyte expression vectors derived from pGEMHE (Liman *et al.*, 1992). Chimeric cDNA constructs were produced using the Splicing by Overlap Extension (SOE) PCR technique (Horton *et al.*, 1989) as previously described (D'hahan *et al.*, 1999a). Hamster SUR1 and rat SUR2A were used as templates for making all the chimeras tested. To minimize errors, PCRs were performed for 25 cycles using the high-fidelity Vent DNA polymerase (New England Biolabs). Site-directed mutagenesis was carried out by PCR amplification of both DNA strands of full-length plasmids with complementary primers mutated to produce

the desired amino acid change (QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit; Stratagene, La Jolla, CA).

The exact amino acid composition of the SUR1-SUR2A chimeric constructs was: A1 = SUR1(M1-V850) + SUR2A(V839-K1545); A2 = SUR1(M1-C1150) + SUR2A(L1118-K1545); A3 = SUR1(M1-D1304) + SUR2A(L1268-K1545); A4 = SUR1(M1-V1361) + SUR2A(L1325-K1545); B1 = SUR1(M1-V850) + SUR2A(V839-V1324) + SUR1(L1362-K1582); B3 = SUR1(M1-I1105) + SUR2A(I1073-V1324) + SUR1(L1362-K1582); B4 = SUR1(M1-I1214) + SUR2A(R1182-V1324) + SUR1(L1362-K1582); B6 = SUR1(M1-A1278) + SUR2A(G1242-V1324) + SUR1(L1362-K1582); B7 = SUR1(M1-A1278) + SUR2A(G1242-V1261) + SUR1(V1299-K1582); B12 = SUR1 with mutations T1286L, M1290T and M1298V; C1 = SUR1(M1-V850) + SUR2A(V839-L1011) + SUR1(A1035-K1582); C2 = SUR1(M1-V850) + SUR2A(V839-I1072) + SUR1(I1106-K1582); C3 = SUR1(M1-I1105) + SUR2A(I1073-R1091) + SUR1(F1125-K1582); D1 = SUR2A with mutations T1286L, M1290T, V1291L and S1292T. Other single- and double-point mutants are designated by the name of the wild-type parent with the mutations indicated in parentheses.

Plasmid DNAs were amplified, confirmed by restriction analysis and sequencing of the PCR-derived regions, linearized and transcribed *in vitro* using the T7 mMessage mMachine kit (Ambion). cRNAs were electroporated on formaldehyde gels and concentrations were estimated from two dilutions using RNA marker as a standard.

cRNAs coding Kir6.2 (~2 ng) and wild-type or modified SURs (~6 ng) were co-injected into defolliculated *Xenopus laevis* oocytes. Injected oocytes were stored at 19°C in Barth's solution [in mM: 1 KCl, 0.82 MgSO<sub>4</sub>, 88 NaCl, 2.4 NaHCO<sub>3</sub>, 0.41 CaCl<sub>2</sub>, 0.3 Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 16 HEPES pH 7.4] with 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 100 µg/ml gentamycin.

### Electrophysiology

Two to 15 days after injection, oocytes were devitellinized and recombinant K<sub>ATP</sub> channels were characterized by the patch-clamp technique in the excised inside-out configuration (Hamill et al., 1981). Patch pipettes (2–10 MΩ) contained (in mM) 154 K<sup>+</sup>, 146 Cl<sup>-</sup>, 5 Mg<sup>2+</sup> and 10 PIPES pH 7.1. The cytoplasmic face of the patch was bathed in solutions that all contained (in mM) 174 K<sup>+</sup>, 40 Cl<sup>-</sup>, 1 EGTA, 1 Mg<sup>2+</sup>, 10 PIPES pH 7.1 and methanesulfonate<sup>-</sup> as the remaining anions. ATP and ADP (potassium salt; Sigma), SR47063 [20 mM stock in dimethylsulfoxide (DMSO); Sanofi Recherche, Montpellier, France], diazoxide (100 mM stock in DMSO; Sigma), P1075 (20 mM stock in DMSO; Leo Pharmaceutical Products, Copenhagen, Denmark) and rilmakalim (a.k.a. HOE 234; 100 mM stock in DMSO; Hoechst, Frankfurt, Germany) were added as specified. The membrane potential was maintained at -50 mV. Experiments were conducted at room temperature (22–24°C).

Applications of the various solutions to the intracellular face of the patch were performed using an RSC-100 rapid-solution-changer (Bio-Logic, Claix, France) controlled by in-house software Perf 2.10. Analog signals were filtered at 300 Hz and sampled at 1 kHz. Slow fluctuations of the no-channel-open baseline of the signal were removed by interactive fitting of the baseline with a spline curve and subtraction of this fit from the signal. Acquisition, analysis and presentation were performed with in-house software Erwin 3.2. The tracings shown in the figures represent continuous records with sporadic solution-switching artifacts blanked out and occasional short segments of superfluous data removed for display purposes. Since the same Kir6.2 subunit is implicitly present in all the reconstituted channels of this study, for the sake of simplicity the text often incorrectly designates a given channel by the name of its SUR subunit. Results are displayed as mean ± SEM.

### Acknowledgements

We thank Mylène Robert for technical assistance with mutant constructs and Dr Patrice Catty for many helpful discussions and advice. We are grateful to Dr J. Bryan (Houston, TX) for hamster SUR1, Dr S. Seino (Chiba, Japan) for mouse Kir6.2 and rat SUR2A, Dr P. Gautier (Sanofi Recherche, Montpellier, France) for SR 47063, Dr L. Billerup (Leo Pharmaceutical Products, Copenhagen, Denmark) for P1075 and Dr A. Terzic (Mayo Clinic, Rochester, MN) for rilmakalim. This work was made possible by grants from the A.F.M. (Association Française contre les Myopathies), A.F.L.M. (Association Française de Lutte contre la Mucoviscidose), the Rhône-Alpes Région with additional support provided by C.E.A. (Commissariat à l'Énergie Atomique) and the C.N.R.S. (Centre National de la Recherche Scientifique). C.M., H.J., A.-L.P. and N.D. were supported by fellowships from La Ligue contre le

Cancer, ARC (Association pour la Recherche contre le Cancer), C.E.A. and La Société des Amis des Sciences, respectively.

### References

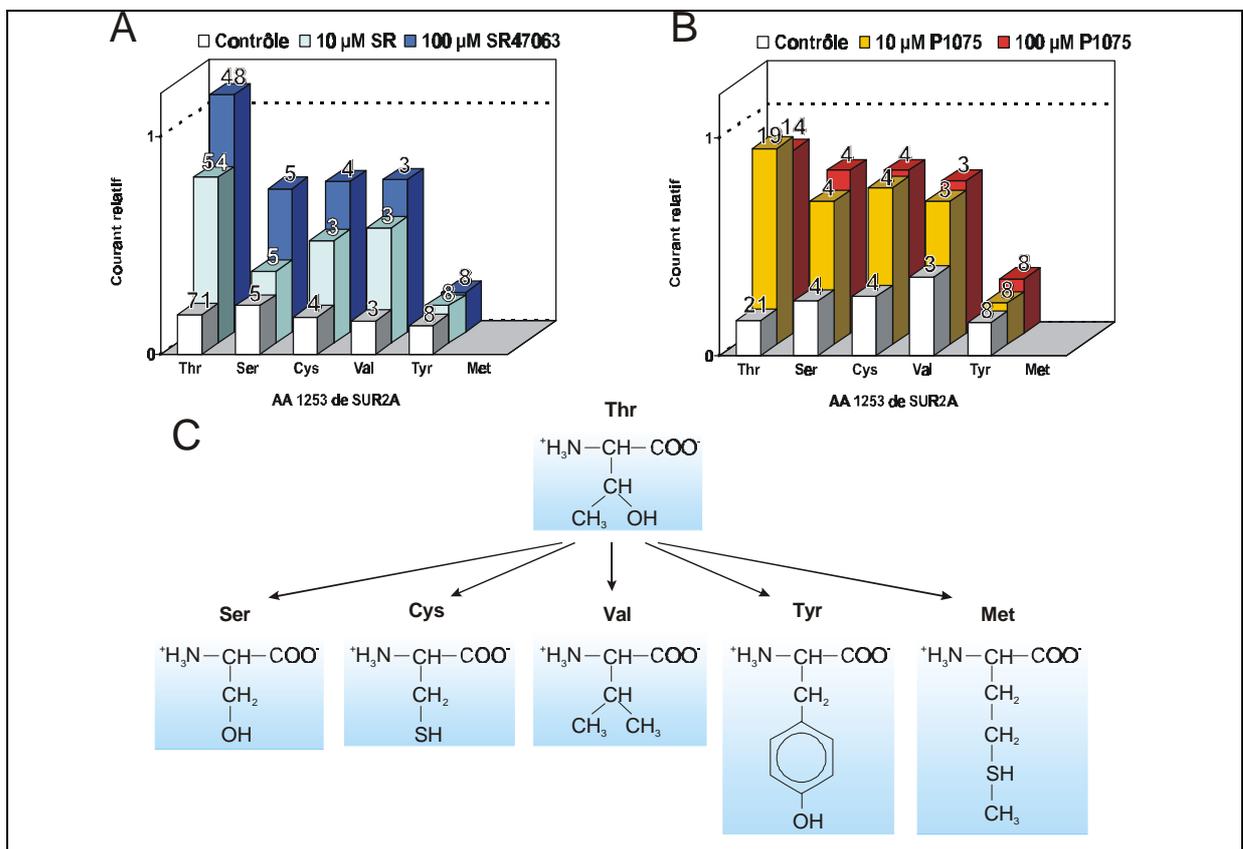
- Aguilar-Bryan, L. et al. (1995) Cloning of the  $\beta$  cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science*, **268**, 423–426.
- Ashcroft, S.J.H. and Ashcroft, F.M. (1990) Properties and functions of ATP-sensitive K-channels. *Cell Signal*, **2**, 197–214.
- Babenko, A.P., Gonzalez, G., Aguilar-Bryan, L. and Bryan, J. (1998) Reconstituted human cardiac K-ATP channels—functional identity with the native channels from the sarcolemma of human ventricular cells. *Circ. Res.*, **83**, 1132–1143.
- Babenko, A.P., Gonzalez, G. and Bryan, J. (2000) Pharmacology of sulfonylurea receptors—separate domains of the regulatory subunits of K-ATP channel isoforms are required for selective interaction with K<sup>+</sup> channel openers. *J. Biol. Chem.*, **275**, 717–720.
- Bienengraeber, M., Alekseev, A.E., Abraham, M.R., Carrasco, A.J., Moreau, C., Vivaudou, M., Dzeja, P.P. and Terzic, A. (2000) ATPase activity of SUR2A: a catalytic function for the K<sub>ATP</sub> channel complex. *FASEB J.*, **14**, 1943–1952.
- Borst, P., Evers, R., Kool, M. and Wijnholds, J. (1999) The multidrug resistance protein family. *Biochim. Biophys. Acta*, **1461**, 347–357.
- Clement, J.P., Kunjilwar, K., Gonzalez, G., Schwannstecher, M., Panten, U., Aguilar-Bryan, L. and Bryan, J. (1997) Association and stoichiometry of K-ATP channel subunits. *Neuron*, **18**, 827–838.
- Colquhoun, D. (1998) Binding, gating, affinity and efficacy: the interpretation of structure–activity relationships for agonists and of the effects of mutating receptors. *Br. J. Pharmacol.*, **125**, 924–947.
- D'hahan, N., Jacquet, H., Moreau, C., Catty, P. and Vivaudou, M. (1999a) A transmembrane domain of the sulfonylurea receptor mediates activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels by K<sup>+</sup> channel openers. *Mol. Pharmacol.*, **56**, 308–315.
- D'hahan, N., Moreau, C., Prost, A.L., Jacquet, H., Alekseev, A.E., Terzic, A. and Vivaudou, M. (1999b) Pharmacological plasticity of cardiac ATP-sensitive potassium channels toward diazoxide revealed by ADP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 12162–12167.
- Dickinson, K.E.J., Bryson, C.C., Cohen, R.B., Rogers, L., Green, D.W. and Atwal, K.S. (1997) Nucleotide regulation and characteristics of potassium channel opener binding to skeletal muscle membranes. *Mol. Pharmacol.*, **52**, 473–481.
- Forestier, C., Pierrard, J. and Vivaudou, M. (1996) Mechanism of action of K channel openers on skeletal muscle K-ATP channels—interactions with nucleotides and protons. *J. Gen. Physiol.*, **107**, 489–502.
- Gopalakrishnan, M., Janis, R.A. and Triggle, D.J. (1993) ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels—pharmacologic properties, regulation, and therapeutic potential. *Drug Dev. Res.*, **28**, 95–127.
- Gribble, F.M., Tucker, S.J. and Ashcroft, F.M. (1997) The essential role of the Walker A motifs of SUR1 in K-ATP channel activation by Mg-ADP and diazoxide. *EMBO J.*, **16**, 1145–1152.
- Gribble, F.M., Tucker, S.J., Seino, S. and Ashcroft, F.M. (1998) Tissue specificity of sulfonylureas: studies on cloned cardiac and  $\beta$ -cell K-ATP channels. *Diabetes Care*, **47**, 1412–1418.
- Hambrock, A., Löffler-Walz, C., Kloor, D., Delabar, U., Horio, Y., Kurachi, Y. and Quast, U. (1999) ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel modulator binding to sulfonylurea receptors SUR2A and SUR2B: opposite effects of MgADP. *Mol. Pharmacol.*, **55**, 832–840.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. and Sigworth, F.J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.*, **391**, 85–100.
- Horton, R.M., Hunt, H.D., Ho, S.N., Pullen, J.K. and Pease, L.R. (1989) Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene*, **77**, 61–68.
- Inagaki, N., Gonoi, T., Clement, J.P., Namba, N., Inazawa, J., Gonzalez, G., Aguilar-Bryan, L., Seino, S. and Bryan, J. (1995) Reconstitution of I-K<sub>ATP</sub>: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science*, **270**, 1166–1170.
- Inagaki, N., Gonoi, T., Clement, J.P., Wang, C.Z., Aguilar-Bryan, L., Bryan, J. and Seino, S. (1996) A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Neuron*, **16**, 1011–1017.
- Inagaki, N., Gonoi, T. and Seino, S. (1997) Subunit stoichiometry of the pancreatic  $\beta$ -cell ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel. *FEBS Lett.*, **409**, 232–236.

- Isomoto, S., Kondo, C., Yamada, M., Matsumoto, S., Higashiguchi, O., Horio, Y., Matsuzawa, Y. and Kurachi, Y. (1996) A novel sulfonylurea receptor forms with BIR (Kir6.2) a smooth muscle type ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel. *J. Biol. Chem.*, **271**, 24321–24324.
- Jacquet, H., Moreau, C., D'hahan, N., Prost, A.L. and Vivaudou, M. (2000) Identification of sulfonylurea receptor regions involved in K-ATP channel activation by cromakalim. *Biophys. J.*, **78**, 464A.
- Lawson, K. (1996) Is there a therapeutic future for 'potassium channel openers'? *Clin. Sci.*, **91**, 651–663.
- Liman, E.R., Tytgat, J. and Hess, P. (1992) Subunit stoichiometry of a mammalian K<sup>+</sup> channel determined by construction of multimeric cDNAs. *Neuron*, **9**, 861–871.
- Loo, T.W. and Clarke, D.M. (1997) Identification of residues in the drug-binding site of human P-glycoprotein using a thiol-reactive substrate. *J. Biol. Chem.*, **272**, 31945–31948.
- Matsuo, M., Tanabe, K., Kioka, N., Amachi, T. and Ueda, K. (2000) Different binding properties and affinities for ATP and ADP among sulfonylurea receptor subtypes, SUR1, SUR2A, and SUR2B. *J. Biol. Chem.*, **275**, 28757–28763.
- Nichols, C.G., Shyng, S.L., Nestorowicz, A., Glaser, B., Clement, J.P., Gonzalez, G., Aguilar-Bryan, L., Permutt, M.A. and Bryan, J. (1996) Adenosine diphosphate as an intracellular regulator of insulin secretion. *Science*, **272**, 1785–1787.
- Pawagi, A.B., Wang, J., Silverman, M., Reithmeier, R.A. and Deber, C.M. (1994) Transmembrane aromatic amino acid distribution in P-glycoprotein. A functional role in broad substrate specificity. *J. Mol. Biol.*, **235**, 554–564.
- Schwanstecher, M., Sieverding, C., Dorschner, H., Gross, I., Aguilar-Bryan, L., Schwanstecher, C. and Bryan, J. (1998) Potassium channel openers require ATP to bind to and act through sulfonylurea receptors. *EMBO J.*, **17**, 5529–5535.
- Sheppard, D.N. and Welsh, M.J. (1992) Effect of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel regulators on cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride currents. *J. Gen. Physiol.*, **100**, 573–591.
- Shyng, S.L. and Nichols, C.G. (1997) Octameric stoichiometry of the K-ATP channel complex. *J. Gen. Physiol.*, **110**, 655–664.
- Shyng, S.L., Ferrigni, T. and Nichols, C.G. (1997) Regulation of K-ATP channel activity by diazoxide and MgADP—distinct functions of the two nucleotide binding folds of the sulfonylurea receptor. *J. Gen. Physiol.*, **110**, 643–654.
- Terzic, A., Jahangir, A. and Kurachi, Y. (1994) Hce-234, a second generation K<sup>+</sup> channel opener, antagonizes the ATP-dependent gating of cardiac ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **268**, 818–825.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4673–4680.
- Tusnády, G.E., Bakos, E., Váradi, A. and Sarkadi, B. (1997) Membrane topology distinguishes a subfamily of the ATP-binding cassette (ABC) transporters. *FEBS Lett.*, **402**, 1–3.
- Ueda, K., Taguchi, Y. and Morishima, M. (1997) How does P-glycoprotein recognize its substrates? *Semin. Cancer Biol.*, **8**, 151–159.
- Uhde, I., Toman, A., Gross, I., Schwanstecher, C. and Schwanstecher, M. (1999) Identification of the potassium channel opener site on sulfonylurea receptors. *J. Biol. Chem.*, **274**, 28079–28082.
- 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.

Received August 10, 2000; revised and accepted October 30, 2000

Nous nous sommes donc intéressés à la thréonine 1253 de SUR2A, impliquée dans l'action des trois ouvreurs antihypertensifs, pour comprendre son rôle exact. Est elle stratégiquement positionnée dans le site de fixation pour former une liaison hydrogène avec les ouvreurs? Ou est-elle une clé conformationnelle pour permettre la fixation des ouvreurs ou la transduction du signal d'activation vers la sous-unité canal ? Son emplacement sur la même face de l'hélice 17 que la leucine1249 (Figure 6 ; Moreau et al., 2000), renforcerait plutôt la première hypothèse.

La méthode employée, est la mutation de la thréonine 1253 en sérine et cystéine pour déterminer l'importance de la longueur de la chaîne latérale ; en valine pour abolir toute possibilité de former des liaisons hydrogènes tout en conservant un encombrement stérique proche de celui de la thréonine ; en tyrosine pour augmenter la taille de la chaîne latérale, en conservant une possibilité de liaison hydrogène (Figure 37).



**Figure 37:** Effet du SR47063 et du P1075 sur différents mutants de la thréonine 1253 de SUR2A.

**A)** Courants relatifs mesurés en présence d'ATP (100µM) (contrôle en blanc), plus du SR47063 (10µM) (bleu ciel), ou du SR47063 (100µM) (bleu foncé), sur des mutants de la thréonine 1253 de SUR2A comme indiqué sous les histogrammes. Les chiffres indiquent le nombre de résultats pris en compte. **B)** Même légende avec en jaune l'activation mesurée en présence d'ATP (100µM) et du P1075 (10µM) et en rouge, de l'ATP (100µM) et du P1075 (100µM). **C)** Structure semi-développée des acides α-aminés remplaçant la Thr1253 de SUR2A. La méthionine correspond au résidu présent à la même position dans SUR1.

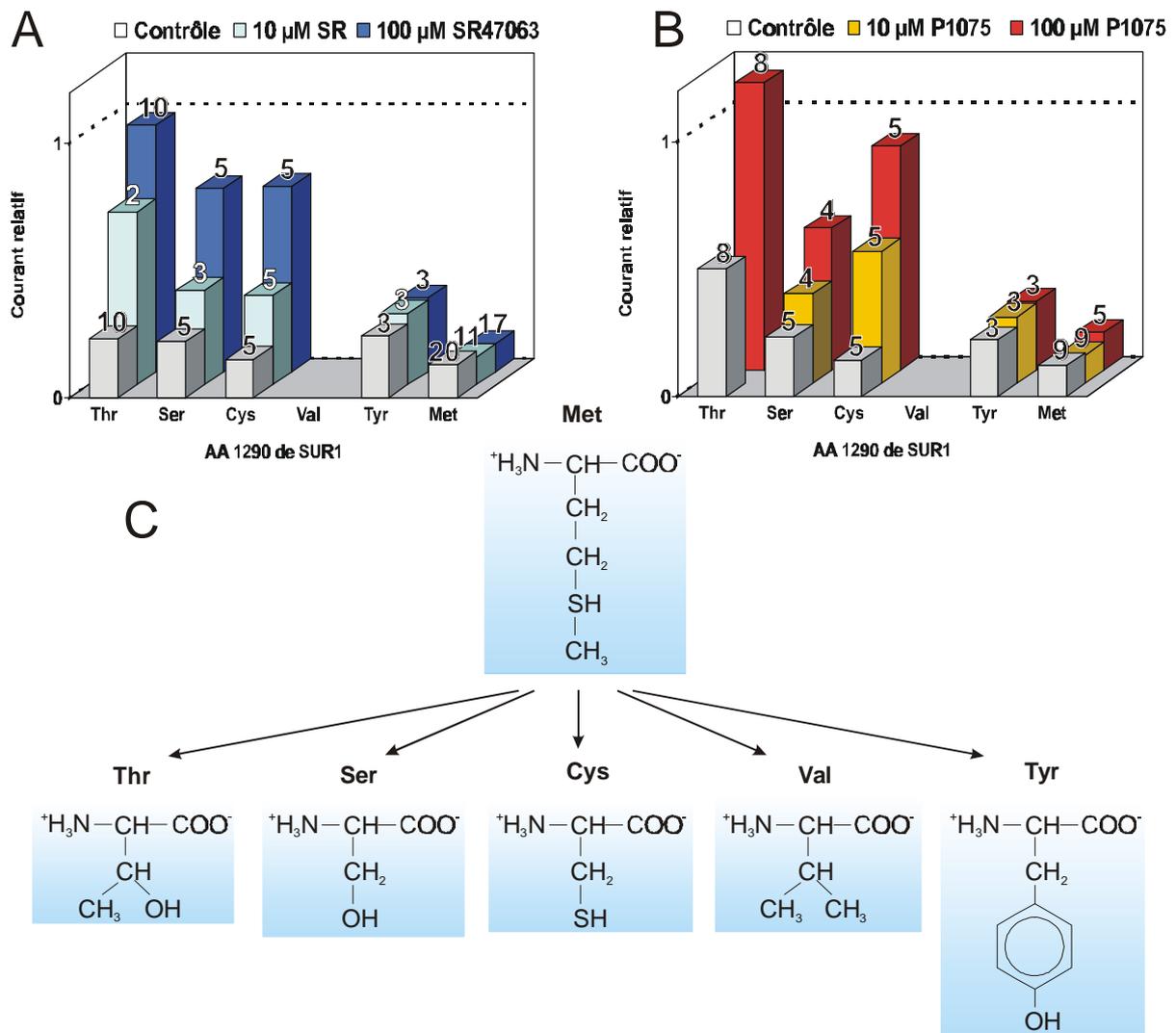
Le mutant SUR2A(T1253**S**) est toujours activé par le SR47063, avec une sensibilité moins importante, tandis que celle pour le P1075 semble peu différente du type sauvage. Le raccourcissement de la chaîne latérale de la thréonine semble n'induire que peu d'effet sur l'action des ouvreurs. Même observation pour le mutant SUR2A(T1253**C**) dont la chaîne latérale de la cystéine possède un encombrement stérique très proche de la sérine, mais avec pour particularité d'être plus enclin à créer des liaisons de coordination que des liaisons hydrogènes. Cependant ce mutant est activé par les ouvreurs, et l'hypothèse d'une absence de liaisons hydrogènes entre la thréonine 1253 et les ouvreurs est confortée par la caractérisation du mutant SUR2A(T1253**V**) qui ne peut créer de liaisons hydrogènes et qui reste cependant activé par le SR47063 et le P1075. Le seul mutant abolissant l'effet de ces ouvreurs est SUR2A(T1253**Y**).

Ainsi, contrairement à l'idée première d'une liaison hydrogène spécifique entre la thréonine 1253 de SUR2A et les ouvreurs, est invalidée, les critères importants pour la spécificité pharmacologique semblent être la position 1253 dans SUR2A et l'encombrement de la chaîne latérale du résidu en cette position dont la taille doit se situer entre le volume occupé par la thréonine et celui occupé par la méthionine.

Ces résultats ont été confirmés par la création des mêmes mutants dans SUR1 à la position 1290 (Met) correspondant à la thréonine 1253 de SUR2A (Figure 38).

Etonnamment, ces résultats confirment que la simple réduction de la chaîne latérale de la méthionine 1290 par sa mutation en thréonine, en sérine (faible sensibilité), en cystéine ou en valine (résultat en cours de confirmation), suffit à conférer à SUR1 la sensibilité au SR47063 et au P1075. Comme pour le mutant SUR2A(T1253**Y**), le mutant SUR1(M1290**Y**) n'est sensible à aucun des deux ouvreurs.

Tous ces résultats témoignent de l'importance de cette position 1253 dans SUR2A ou 1290 dans SUR1 pour la sensibilité des canaux  $K_{ATP}$  aux ouvreurs antihypertensifs. Le mystère du mécanisme d'action de ces activateurs semble résider dans l'encombrement de la chaîne latérale, avec un optimum apparent pour celui occupé par la thréonine.

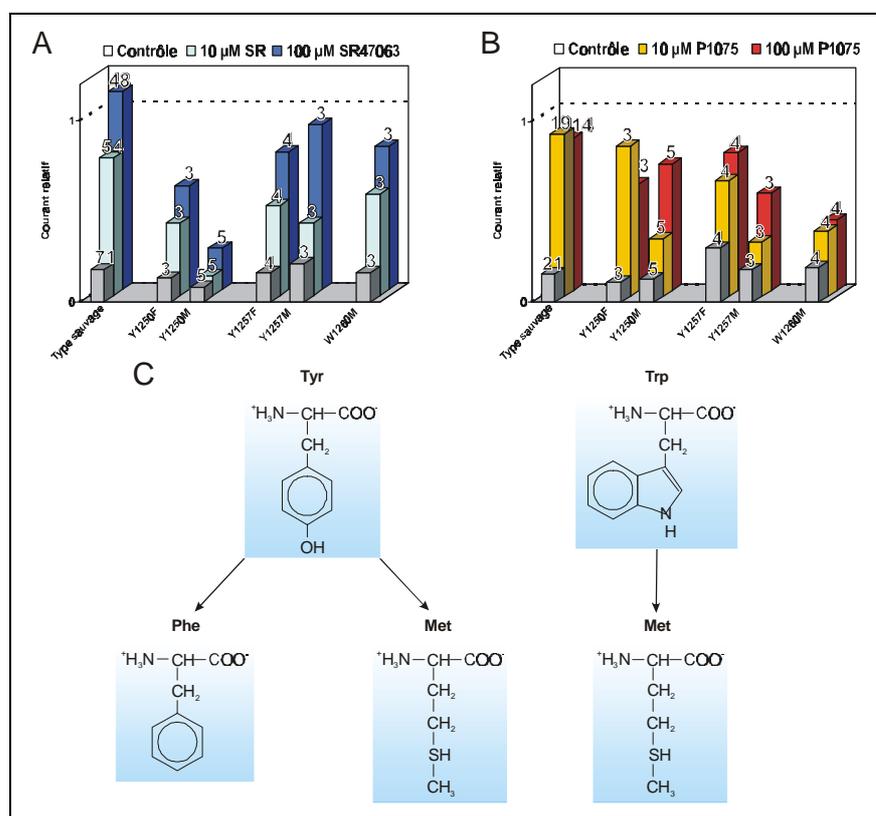


**Figure 38:** Effet du SR47063 et du P1075 sur différents mutants de la méthionine 1290 de SUR1.

**A)** Courants relatifs mesurés en présence d'ATP (100μM) (contrôle en gris), plus du SR47063 (10μM) (bleu ciel), ou du SR47063 (100μM) (bleu foncé), sur des mutants de la méthionine 1290 de SUR2A comme indiqué sous les histogrammes. Les chiffres indiquent le nombre de résultats pris en compte. **B)** Même légende avec en jaune l'activation mesurée en présence d'ATP (100μM) et du P1075 (10μM) et en rouge, de l'ATP (100μM) et du P1075 (100μM). **C)** Structure semi-développée des acides α-aminés remplaçant la Met1290 de SUR2A. La thréonine correspond au résidu présent à la même position dans SUR2A.

Un seul résidu ne pouvant former un site de fixation, nos recherches se sont orientés vers des résidus proches de la thréonine 1253, qui seraient identiques ou homologues entre les deux isoformes, et auraient la capacité de fixer les ouvreurs potassiques qui sont des molécules hydrophobes et composées de noyaux aromatiques. L'analyse du schéma de l'hélice 17 (*Figure 6* ; Moreau et al., 2000) révèle que la thréonine 1253 de SUR2A se situe entre deux tyrosines [SUR2A(Y1250) et SUR2A(Y1257)] disposant de noyaux aromatiques plans, capables de fixer aspécifiquement d'autres noyaux aromatiques par des

phénomènes "d'intercalage" (stacking) avec fusion partielle du nuage d'électrons  $\pi$  des deux noyaux. L'encombrement de la position 1253 empêcherait alors une bonne fixation des ouvreurs et abolirait leur effet sur l'isoforme SUR1(M1290) ou les mutants SUR2A(T1253Y), SUR1(M1290Y). Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons muté les tyrosines en phénylalanines pour déterminer l'importance du groupement hydroxyle dans la fixation des ouvreurs, puis en méthionine pour conserver un encombrement important et hydrophobe sans noyau aromatique, abolissant ainsi toute possibilité "d'intercalage" avec les ouvreurs. Le tryptophane 1260 de SUR2A a également été muté en méthionine, car il est situé sur la même face de l'hélice 17 que la thréonine 1253 et peut être impliqué dans ces phénomènes "d'intercalage". Ces mutations n'ont été réalisées que sur l'isoforme SUR2A car elles ont pour but de mesurer une perte de fonction, qui ne pourrait être observée sur une isoforme déjà insensible (Figure 39).



**Figure 39:** Effet du SR47063 et du P1075 sur les mutants des résidus aromatiques de l'hélice 17 de SUR2A.

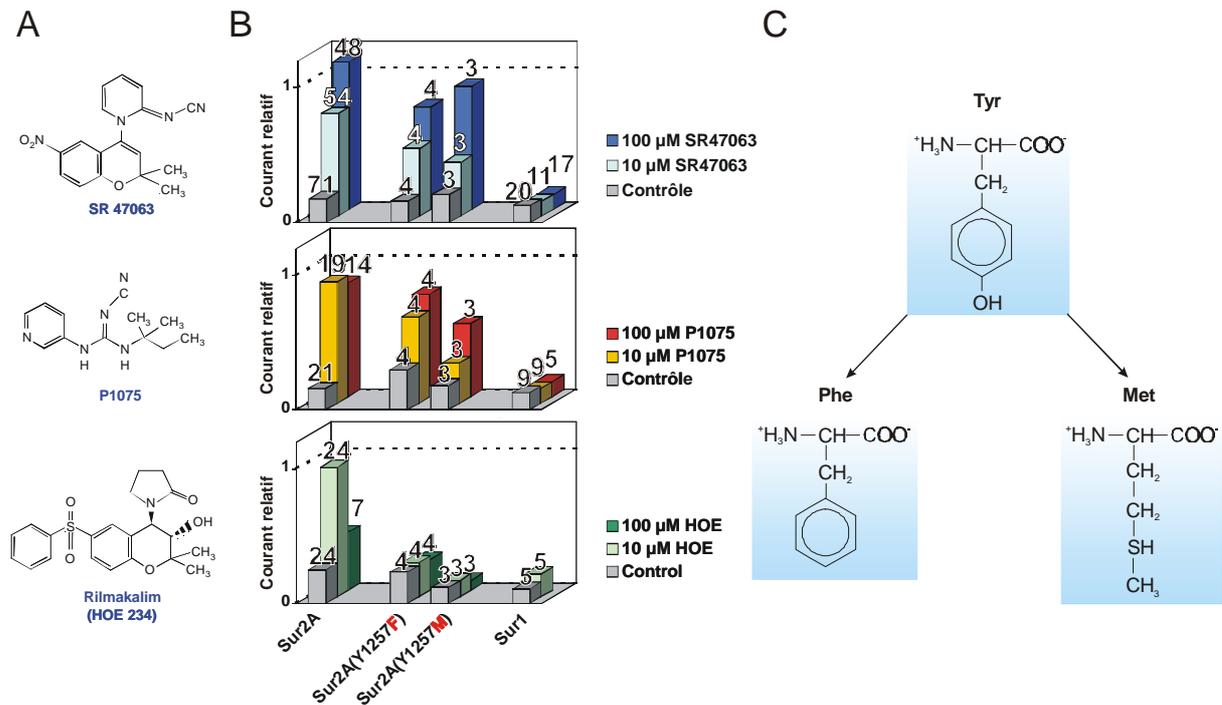
**A)** Courants relatifs mesurés en présence d'ATP (100 $\mu$ M) (contrôle en gris), plus du SR47063 (10 $\mu$ M) (bleu ciel), ou du SR47063 (100 $\mu$ M) (bleu foncé), sur des mutants des tyrosines 1250 et 1257 et du tryptophane 1260 de SUR2A comme indiqué sous les histogrammes. Les chiffres indiquent le nombre de résultats pris en compte. **B)** Même légende avec en jaune l'activation mesurée en présence d'ATP (100 $\mu$ M) et du P1075 (10 $\mu$ M) et en rouge, de l'ATP (100 $\mu$ M) et du P1075 (100 $\mu$ M). **C)** Structure semi-développée des acides  $\alpha$ -aminés remplaçant les tyrosines et le tryptophane de l'hélice 17 de SUR2A.

La sensibilité au SR47063 des canaux  $K_{ATP}$  est diminuée par la mutation de la tyrosine 1250 en phénylalanine, et presque annihilée par la mutation en méthionine, tandis que les mutations de la tyrosine 1257 ou du tryptophane 1260, ne semblent pas affecter la sensibilité au SR47063 (Figure 39A).

Avec le P1075 on observe des résultats différents. Les plus remarquables sont la diminution significative de la sensibilité au P1075 lorsqu'une des deux tyrosines est mutée en méthionines [SUR2A(Y1250M) et SUR2A(Y1257M)] (Figure 39B). Même constatation pour le mutant SUR2A(W1260M).

Ceci appuie le bien-fondé de l'hypothèse "d'intercalage" de l'ouvreur entre les résidus aromatiques, dont la double mutation des deux tyrosines en méthionine devrait empêcher la fixation du P1075 et ainsi abolir totalement son effet. Cependant, la diminution ou l'absence d'activation observée peut être due à des effets indirects dus à la déstabilisation de la structure locale, effets que des expériences de mesures de fixation (binding) pourraient mettre en évidence. Nous ne pouvons donc affirmer que les résidus aromatiques sont directement impliqués dans la fixation des ouvreurs, mais seulement qu'ils sont importants de par leur nature, dans l'action du P1075 et dans une moindre mesure, dans celle du SR47063.

Ces résultats démontrent une nouvelle fois des différences de "comportement" entre les ouvreurs. Cette constatation est encore plus flagrante lorsque l'on se focalise sur les mutants de la tyrosine 1257 (Figure 40).



**Figure 40:** Effet de trois ouvreurs (SR47063, P1075 et HOE234) sur les mutants de la tyrosine 1257 de SUR2A.

**A)** Structure semi-développée des ouvreurs potassiques. **B)** Courants relatifs mesurés sur les constructions indiquées en abscisse en présence d'ATP (100µM) (contrôle en gris), plus du SR47063 (10µM) (bleu ciel), ou du SR47063 (100µM) (bleu foncé), ou du P1075 (10µM) (en jaune) ou du P1075 (100µM) (en rouge) ou du HOE234 (10µM) (en vert clair), ou encore du HOE234 (100µM) (en vert foncé). Les chiffres indiquent le nombre de résultats pris en compte. **C)** Structure semi-développée des acides α-aminés remplaçant la tyrosine 1257 de l'hélice 17 de SUR2A.

Les diagrammes de la Figure 40B démontrent clairement, que la mutation de la tyrosine 1257 de SUR2A en phénylalanine ou en méthionine diminue fortement la sensibilité pour le HOE234, significativement celle pour le P1075, et relativement peu celle pour le SR47063. Cette différence de réponse des ouvreurs à la mutation d'un résidu aromatique pourrait s'expliquer par un site de fixation vaste ressemblant à la "chambre" de MsbA (Figure 17, page 65) dans laquelle le lipide A (le substrat de la protéine) s'introduit, en étant retenu apparemment sans véritables liaisons uniquement par répulsion hydrophobe. Ainsi, les ouvreurs introduits dans cette "chambre" de SUR interagiraient différemment avec les résidus hydrophobes selon leur structure, leur encombrement et/ou les centres électro-négatifs ou positifs qui les composent. Le site critique, indispensable à la bonne fixation des ouvreurs seraient la position 1253 de SUR2A ou 1290 de SUR1 qui ne doit pas être trop volumineux.

## **DISCUSSION**

## 7. DISCUSSION

### 7.1. Le site de liaison des ouvreurs

#### 7.1.1. Les différentes hypothèses

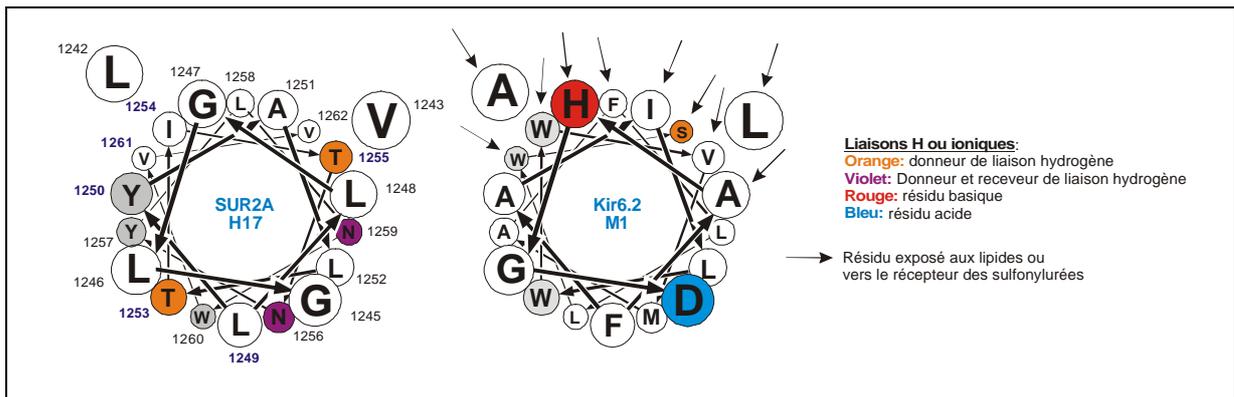
Le site de liaison des ouvreurs potassiques semble donc se situer dans la dernière hélice transmembranaire du récepteur des sulfonyles. Tout au moins, les résidus Thr1253 et Leu1249 sont des déterminants importants pour la spécificité d'action des ouvreurs agissant sur SUR2A. De manière surprenante, un seul de ces deux résidus incorporés en lieu et place dans l'isoforme SUR1 suffit à lui conférer la sensibilité aux ouvreurs potassiques agissant spécifiquement sur SUR2A. Les études de mutagenèse dirigée menées sur la thréonine 1253, révélèrent que contrairement aux idées premières, le groupement hydroxyle de la chaîne latérale ne forme pas de liaison hydrogène spécifique avec les ouvreurs et que la polarité du résidu n'est pas cruciale. La taille de la chaîne latérale semble être le seul critère important pour conférer la spécificité pharmacologique de SUR2A à SUR1. En effet, la méthionine ou la tyrosine, aux chaînes latérales d'encombrement stérique supérieur à celui de la thréonine, empêche toute action des ouvreurs. De plus, les résidus aromatiques présents dans le proche environnement de la thréonine et situés sur la même face de l'hélice  $\alpha$ , sont également impliqués dans l'efficacité d'action des ouvreurs.

Tout ceci concourt à conclure que la face contenant la thréonine 1253, la leucine 1249 et les résidus aromatiques de l'hélice 17 de SUR2A forment un "relief" particulier nécessaire à l'action des ouvreurs antihypertensifs. De fait, plusieurs hypothèses peuvent expliquer les raisons de ce motif si particulier qui ne doit pas être trop encombrant. (i) La plus évidente milite pour la présence du site de fixation des ouvreurs dans cette région. Ce site correspondrait à une poche hydrophobe relativement informe, comme dans la structure de MsbA (Figure 16, page 64), pour laquelle toutes les hélices  $\alpha$  de SUR participeraient, et qui serait capable de fixer des molécules aux structures très diverses. Les résidus qui composeraient cette poche sont soit communs entre SUR1 et SUR2A, soit différents mais sans conséquence sur la fixation des ouvreurs, ce qui expliquerait qu'ils ne peuvent être mis en évidence par une approche chimérique.

La spécificité pharmacologique entre ces deux isoformes proviendrait de l'encombrement stérique lié à la présence de la chaîne latérale de la méthionine 1290 (position équivalente à Thr1253 dans SUR2A) dans SUR1 qui empêcherait la fixation des ouvreurs antihypertensifs. L'hypothèse du site de fixation sur cette face est renforcée par les travaux de Uhde et al., 1999 qui ont démontré que cette partie du TMD2 contenant l'hélice 17 est importante pour la fixation des ouvreurs, et la découverte dans la même région, de résidus impliqués dans la liaison de composés anticancéreux par P-gp (Loo et Clarke, 1999) et MRP1 (Ito et al., 2001). De plus, la présence des résidus aromatiques très conservés entre les transporteurs ABC de type MRP/CFTR et proches dans l'environnement spatial de la thréonine 1253 expliquerait dans ce cas, la capacité de molécules aux structures très diverses à activer les canaux  $K_{ATP}$ . En effet, le point commun entre tous les ouvreurs est la présence de cycles aromatiques et leur caractère relativement hydrophobe. Il est possible que cette faible spécificité de reconnaissance soit due à des interactions aspécifiques entre les noyaux aromatiques selon un phénomène dit de "stacking" qui correspond à un chevauchement des nuages électroniques des cycles insaturés plans, comme deux tranches superposées l'une sur l'autre. Cette interaction est très forte et spécifique aux noyaux aromatiques, son exemple le plus connu est l'intercalation du bromure d'éthidium entre les bases azotées de l'ADN. L'hélice 17 ressemble en partie à cet exemple car les noyaux aromatiques sont situés du même côté de l'hélice (la face contenant Thr1253) et pourraient fixer les ouvreurs entre les tyrosines et/ou le tryptophane à condition que le résidu en position 1253 ne soit pas trop encombrant.

(ii) Une autre hypothèse plus compliquée est basée sur l'observation de la structure de MsbA, indiquant que la poche (ou chambre), dans laquelle se fixe le substrat, est vaste et ne se cantonne pas à quelques résidus. Elle est plutôt la résultante d'un environnement globalement hydrophobe dans lequel la substitution d'une thréonine de l'hélice 17 en une méthionine ne pourrait avoir ce pouvoir si sélectif sur la pharmacologie des canaux  $K_{ATP}$ . De fait, le résidu en position 1253 de SUR2A aurait une chaîne latérale de taille limitée non plus pour la fixation de tous les ouvreurs, mais pour la transmission du signal d'activation. Ainsi le changement conformationnel du récepteur des sulfonylurées dû à la fixation des ouvreurs, se propagerait vers Kir6.2 *via* ce résidu charnière.

Pour approfondir cette supposition, nous pouvons comparer l'hélice 17 schématisée de SUR2A et l'hélice M1 de Kir6.2 modélisée selon les données cristallographiques de KcsA. L'hélice M1 de Kir6.2 est également appelée hélice externe (outer helix) car non impliquée directement dans le pore, par contre elle interagit avec l'hélice M2 de la même sous-unité et les autres hélices M1 du tétramère, ne laissant que quelques résidus (8 au total) disponibles pour interagir avec les lipides ou avec le récepteur des sulfonylurées (Figure 41).



**Figure 41 :** Hélices  $\alpha$  17 de SUR2A et M1 de Kir6.2 schématisées vues de la face extracellulaire.

Parmi ces résidus se trouvent 3 résidus aromatiques (2 tryptophanes et une phénylalanine) situés sur une même face de l'hélice comme dans l'hélice 17 de SUR2A. Si ce n'est une coïncidence, nous pouvons imaginer un mécanisme basé sur l'intercalage des chaînes latérales des trois résidus aromatiques de Kir6.2 (M1) avec les trois résidus aromatiques de l'hélice 17 du récepteur des sulfonylurées. Les cycles plans seraient orientés perpendiculairement à l'axe de leur hélice respective et placés les uns au dessus des autres à la manière d'un mille-feuilles. La fixation d'un ouvreuseur sur son site, qui peut impliquer une autre face de l'hélice 17, induirait une rotation ou un déplacement même léger de l'hélice 17. Les liaisons intercycles étant très fortes, et plus encore lorsqu'elles sont multipliées par trois, tout mouvement de l'hélice 17 entraînera, par ses cycles aromatiques, ceux de Kir6.2 modifiant la conformation du canal qui est alors activé. Cette voie de transmission du signal d'activation des ouvreuseurs ne serait pas fonctionnelle dans le cas de SUR1 car la chaîne latérale de la méthionine 1290 située entre les deux tyrosines gênerait stériquement soit l'intercalage des noyaux aromatiques, soit le changement conformationnel en lui-même.

Aussi séduisante soit-elle, cette hypothèse n'explique pas l'absence de fixation des ouvreurs antihypertensifs sur SUR1, ni une activation de SUR1 par le diazoxide. A noter que ce dernier semble être un ouvreur de classe et de mécanisme d'action différent des autres ouvreurs, car son action est MgADP-dépendante sur SUR2A, et non sur SUR1, et il a la capacité d'activer la majorité de nos constructions chimériques et mutants de l'hélice 17.

(iii) D'où une troisième hypothèse, selon laquelle Thr1253 serait une clé pour l'accessibilité des ouvreurs à leur site de fixation sans qu'elle soit directement impliquée dans des liaisons. Un résidu trop encombrant empêcherait l'ouverture du site et expliquerait leur incapacité à se fixer sur SUR1. La position 1253 serait de nouveau impliquée dans un rôle de "charnière" conformationnelle, non plus pour transmettre un signal, mais pour permettre l'accès des ouvreurs à leur site de fixation.

(iv) Koster et al., 1999, proposent une autre hypothèse selon laquelle les sous-unités Kir6.2/SUR se découpleraient fonctionnellement durant l'activation et se réaccoupleraient lors de la phase d'inhibition. Cette proposition est basée sur la différence de sensibilité à l'ATP entre Kir6.2 seul (tronqué) et Kir6.2 associé avec le récepteur des sulfonyleurées. Étonnamment, les canaux sont plus sensibles à l'ATP en présence de SUR ( $K_i = \sim 10\mu\text{M}$ ) que sans cette présence ( $K_i = \sim 100\mu\text{M}$ ). Ainsi, en se découplant de SUR consécutivement à la fixation d'activateur, les sous-unités Kir6.2 deviennent moins sensibles à l'ATP et semblent ainsi activées. Dans ce modèle, les hypothèses précédentes restent valables, à savoir que le site de fixation des ouvreurs pourrait être dans ce cas à l'interface entre l'hélice 17 de SUR2A et l'hélice M1 de Kir6.2, juste entre les résidus aromatiques et au niveau de la thréonine 1253. La fixation des ouvreurs déplacerait les noyaux aromatiques de Kir6.2, provoquant le découplage des sous-unités et activant les canaux  $K_{\text{ATP}}$  en diminuant la sensibilité à l'ATP des sous-unités Kir6.2 isolées.

La face de l'hélice 17 de SUR2A devient ainsi site de fixation et voie de transmission du signal d'activation directement entre SUR et Kir6.2. SUR1 serait insensible aux ouvreurs antihypertensifs, car l'encombrement de la chaîne latérale de la méthionine 1290 ne permettrait pas une "bonne" fixation des ouvreurs, ou du moins avec trop peu d'affinité pour dissocier les noyaux aromatiques des deux sous-unités. Ainsi pour être efficaces dans ce modèle, les ouvreurs doivent posséder au moins un noyau aromatique, être très hydrophobes pour s'insérer entre ces hélices

et être suffisamment encombrants pour expulser les noyaux aromatiques de Kir6.2 et repousser son hélice M1. Dans ce modèle et dans les hypothèses précédentes, le diazoxide aurait une autre voie d'activation spécifique.

Toutefois, des expériences de mesures de fixation (binding) démontrent que les ouvreurs sont capables de se fixer sur le récepteur des sulfonylurées en absence de Kir6.2, mais surtout que cette fixation requiert de l'ATP hydrolysable (Schwanstecher M et al., 1998). Le mécanisme est donc plus compliqué qu'une simple fixation-dissociation si tel est le cas. De plus la constante de demi-inhibition de l'ATP pour Kir6.2 isolé n'est que 10 fois plus élevée en présence de SUR, et reste dans des proportions submicromolaires, tandis que les concentrations intracellulaires d'ATP sont supérieures à 3mM en moyenne. Donc même dissocié de SUR, Kir6.2 isolé ne serait pas suffisamment moins sensible à l'ATP pour être activé en conditions physiologiques. Néanmoins, d'autres effecteurs peuvent s'ajouter à cet effet pour diminuer encore la sensibilité à l'ATP, et c'est le cas des phospho-inositides PIP et PIP<sub>2</sub>.

### **7.1.2. PIP<sub>2</sub>**

Comme décrit dans l'introduction, PIP et PIP<sub>2</sub> sont des phospholipides poly-phosphorylés et par conséquent chargés très négativement (peut-être même les plus électronégatifs de tous les phospholipides connus) au niveau de leur tête polaire. Ils sont également des activateurs endogènes des canaux K<sub>ATP</sub>. Dans leur modèle de dissociation des sous-unités, Koster et al., 1999, ont testé le PIP<sub>2</sub> qui augmentait fortement la probabilité d'ouverture de canaux mutants, dont les mutations (Asn30 et Leu164) au niveau de Kir6.2 sont censées favoriser le découplage inter-sous-unités. Ainsi PIP<sub>2</sub> pourrait s'insérer aisément entre les hélices (Schwappach et al., 2000), d'autant plus facilement que les ouvreurs auront préalablement préparé le découplage. PIP<sub>2</sub> serait attiré par le champ électropositif induit par les nombreux résidus basiques présents dans les parties cytoplasmiques de Kir6.2, cependant une seule arginine (R176A) semble impliquée dans ce processus (Krauter et al., 2000). Ce champ électropositif pourrait attirer et conduire l'ATP vers son site inhibiteur, d'autant plus efficacement que la molécule est chargée électronégativement (l'ATP<sup>4-</sup> est plus inhibiteur que l'ADP<sup>3-</sup>). PIP<sub>2</sub> influencerait ainsi l'attraction et par conséquent la fixation de l'ATP sur Kir6.2 qui semblerait moins inhibé par l'ATP. L'action de PIP<sub>2</sub> serait ainsi due soit à la neutralisation du champ électropositif attracteur, soit à la

répulsion électrostatique des molécules ATP<sup>4-</sup>. En s'associant à Kir6.2, SUR repousserait les molécules de PIP<sub>2</sub> qui se retrouveraient éloignées du site inhibiteur de l'ATP, trop éloignées pour avoir une quelconque influence sur Kir6.2. Les canaux K<sub>ATP</sub> octamériques nous semblent alors plus sensibles à l'ATP.

Un autre point remarquable allant dans le sens de cette hypothèse, est la présence dans les domaines cytoplasmiques du récepteur des sulfonylurées, de 15 résidus successifs chargés négativement entre le NBD1 et le TMD2. Cette séquence pourrait favoriser le découplage SUR-Kir6.2 lors de l'insertion de PIP<sub>2</sub> entre l'hélice 17 et l'hélice M1. Cependant, la cinétique d'activation très rapide des canaux K<sub>ATP</sub> s'accorde mal avec un phénomène de diffusion de phospholipides entre deux protéines. Donc PIP<sub>2</sub>, même s'il ne peut être l'unique activateur ou messenger du signal d'activation, pourrait agir en synergie avec les ouvreurs qui ont certainement une action "directe" sur le canal. PIP<sub>2</sub> pourrait être qualifié de co-activateur réduisant l'effet inhibiteur de l'ATP intracellulaire fortement concentré dans le cytosol.

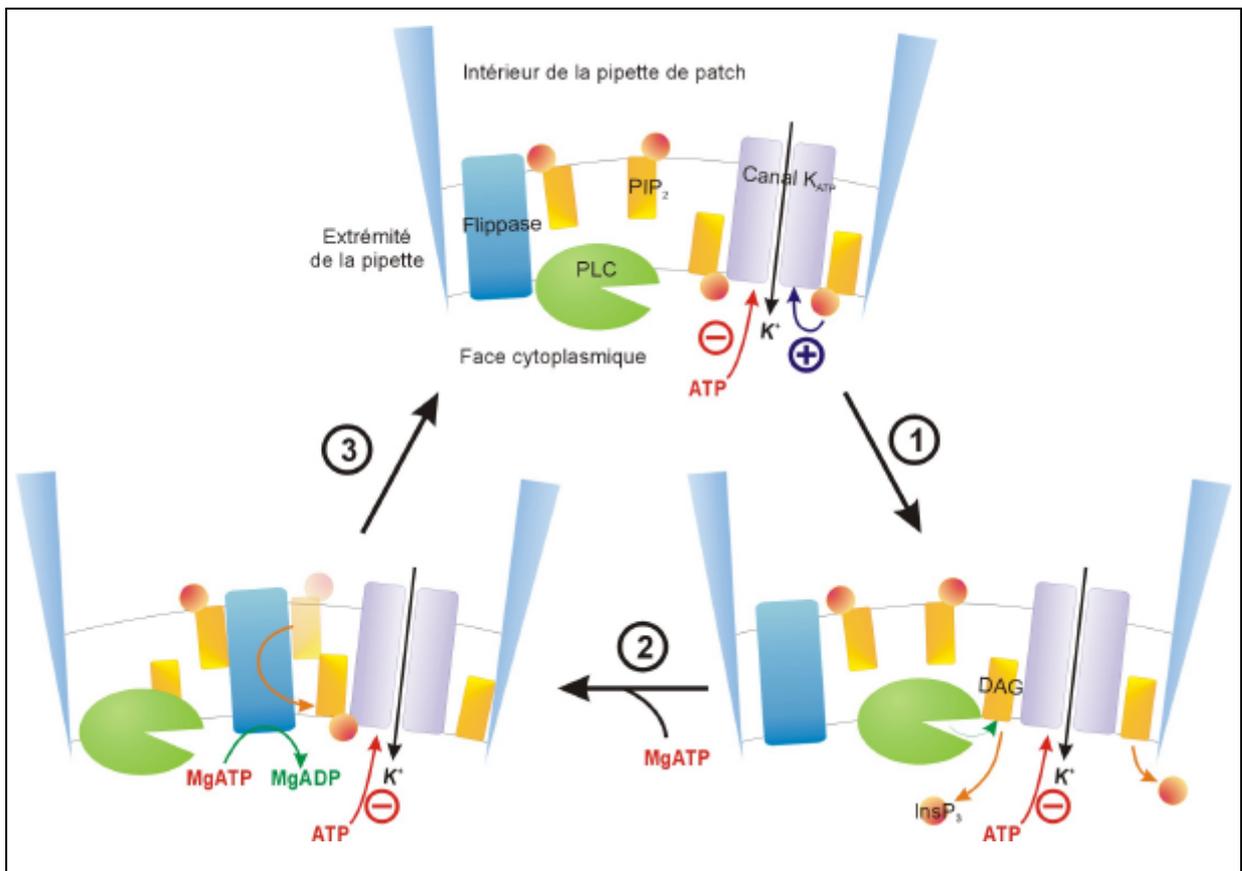
#### 7.1.2.1. Run down et flippase

Le "run down" correspond à une désactivation progressive des canaux lors de patch en mode excisé. Dans le cas des canaux K<sub>ATP</sub>, l'ajout de MgATP suffit à restaurer une activité de valeur proche de celles de début d'expérience. Différents auteurs proposaient une phosphorylation du canal comme cela est le cas pour CFTR, mais cette phosphorylation n'a pas été démontrée à ce jour sur le récepteur des sulfonylurées. Cependant l'équipe de Colin Nichols propose un effet du PIP<sub>2</sub> sur le "run down", dont l'origine serait une déphosphorylation progressive de ce phospholipide dans les patch excisés, et une re-phosphorylation du PIP en PIP<sub>2</sub> en présence de MgATP, réactivant ainsi les canaux.

En utilisant cette hypothèse de co-activation des canaux K<sub>ATP</sub> par PIP<sub>2</sub>, j'en propose une autre selon laquelle le run down ne serait pas dû à une phosphorylation ou autre action directe de MgATP sur SUR ou PIP, mais à une perte progressive et définitive de PIP<sub>2</sub> présent sur le feuillet interne des extraits de membrane plasmique. En effet, lors de l'excision, de nombreuses protéines membranaires endogènes sont entraînées dans la pipette de patch en même temps que les canaux. Parmi celles-ci, se trouvent très certainement la phospholipase C qui est ubiquitaire et très importante pour la production de messagers secondaires dans la cellule puisque son activité consiste à hydrolyser le PIP<sub>2</sub> en DAG (DiAcyl-Glycérol) et en InsP3 (Inositol

1,4,5 Triphosphate). Ce dernier se fixera sur son récepteur du réticulum endoplasmique et induira la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme comme messenger "tertiaire". De fait, en configuration excisée, la phospholipase C continue d'hydrolyser le  $\text{PIP}_2$  dont la quantité diminue progressivement au cours de l'expérience, provoquant une désactivation progressive des canaux  $\text{K}_{\text{ATP}}$  (Figure 42).

Dans ce cas, quel rôle joue le  $\text{MgATP}$ , dont l'ajout suffit à restaurer leur activité ? La membrane plasmique présente une composition asymétrique de phospholipides qui sont majoritairement négatifs sur le feuillet interne et positifs sur le feuillet externe. Pour conserver cette asymétrie, la cellule utilise des protéines flippases, qui ont pour rôle de transporter certains lipides d'un feuillet vers l'autre. Ce phénomène énergétiquement très défavorable en leur absence a un coût qui se traduit par l'hydrolyse de molécules de  $\text{MgATP}$ . D'où l'idée qu'en ajoutant du  $\text{MgATP}$  lors d'expériences de patch clamp, les flippases peuvent de nouveau fonctionner et transporter le  $\text{PIP}_2$  présent sur le feuillet externe vers le feuillet interne, restaurant ainsi l'activité primaire des canaux  $\text{K}_{\text{ATP}}$ . Cette hypothèse permettrait d'expliquer pourquoi certaines expériences de patch sont dépourvues de run down (absence de phospholipase C dans l'extrait de membrane), de même que ce phénomène n'existe pas en configuration cellule entière (présence de grande quantité de  $\text{MgATP}$  intracellulaire et de flippases membranaires). Il serait aisé de vérifier cette hypothèse en utilisant des inhibiteurs spécifiques de phospholipases. Leur application devrait inhiber le run down dans les patchs qui en sont pourvus. A noter que le  $\text{PIP}_2$  n'est peut-être pas le seul phospholipide chargé négativement qui soit capable de "co-activer" les canaux  $\text{K}_{\text{ATP}}$ , d'où la nécessité de bloquer toutes les phospholipases lors de ces expériences.



**Figure 42 :** Modèle Phospholipase C – Flippase pour expliquer les phénomènes de "run-down".

**1)** Le fragment de membrane excisé comprend non seulement les canaux  $K_{ATP}$  qui nous intéressent, mais également du Phosphatidyl Inositol 4,5-*bis*Phosphate ( $PIP_2$ ) et des protéines endogènes des ovocytes de *Xénope*, telles que la PhosphoLipase C (PLC) et des flippases. Le  $PIP_2$  active les canaux, tandis que l'ATP que nous appliquons sur la pipette de patch les inhibe. **2)** Au cours de l'expérience, la PLC hydrolyserait le  $PIP_2$  en DiAcyl-Glycéril (DAG) et en Inositol 4,5 *bis*Phosphate ( $InsP_3$ ), et diminuerait ainsi l'activation des canaux  $K_{ATP}$  (caractéristique du "run down"). **3)** L'ajout de MgATP ( $> 1mM$ ) permettrait l'activité des flippases qui rétabliraient l'asymétrie membranaire en incorporant de nouvelles molécules de  $PIP_2$  sur le feuillet interne (siège de l'activation des canaux  $K_{ATP}$ ). Puis de nouveau, la PLC hydrolyse le  $PIP_2$  du feuillet interne jusqu'à ce que l'effet soit contrebalancé par les flippase durant les phases d'application de MgATP ( $> 1mM$ ).

### 7.1.3. Proposition de poursuite du projet

La modélisation du récepteur des sulfonylurées selon les données cristallographiques de MsbA, devrait permettre de déterminer quelle est l'hypothèse la plus vraisemblable. En effet, même avec une faible résolution de 4,5Å qui ne permet pas de connaître l'orientation des chaînes latérales, nous pourrions déterminer la position des carbones  $\alpha$  de chaque résidu et notamment ceux de l'hélice 17 de SUR2A, nous fournissant une idée de l'orientation de la face contenant la thréonine 1253 et les résidus aromatiques.

S'ils sont orientés vers l'intérieur de la "chambre", ils sont certainement impliqués dans le site de fixation, tandis qu'une orientation vers l'extérieur de la "chambre", présagerait plutôt une implication de la thréonine 1253 dans la transmission du signal d'activation ou d'une interaction directe avec l'hélice M1 de Kir6.2. Nous pourrions vérifier cette possibilité en utilisant les données cristallographiques de KcsA sur lesquelles Serge Crouzy a déjà travaillé au sein du laboratoire (Crouzy S et al., 2001).

Il est également nécessaire de réaliser des expériences de fixation (binding) sur les mutants SUR2A T1253Y et T1253C pour déterminer pourquoi le premier n'est plus activé (est-ce dû à une perte de fixation de l'ouvreur ou existe-t-il toujours une fixation, mais plus d'activation ?), et le deuxième, afin de prévoir des expériences de saturation de site avec des molécules réagissant spécifiquement avec les cystéines. Nous saurons ainsi si cette position 1253 de SUR2A doit avoir un encombrement faible pour permettre la fixation des ouvreurs ou si elle n'intervient qu'après la fixation pour transmettre le signal d'activation.

## **7.2. Interaction NBD-ouvreurs**

Comme le démontre la présence nécessaire de MgADP pour observer un effet du diazoxide sur SUR2A, les domaines de liaison de nucléotides (NBD) jouent un rôle fondamental dans l'action des ouvreurs. Il existe donc des interactions entre des molécules synthétiques et des activateurs endogènes *via* ces domaines. Cependant, leur fonction reste un mystère, même si nous savons désormais qu'ils hydrolysent l'ATP (Bienengraeber et al., 2000). L'augmentation de l'activité ATPase de ces NBD en présence d'ouvreurs confirmerait le postulat selon lequel ces composés se comporteraient comme des substrats transportés par le récepteur des sulfonylurées, transporteur ABC sans activité de transport mis en évidence à ce jour (Zingman et al., 2001).

L'activité des ouvreurs transiterait donc par le changement conformationnel de SUR lors du transport ATP-dépendant des molécules, et induirait par la même occasion, un changement conformationnel de Kir6.2 favorisant le passage des ions potassiques. Toutefois, des activations du canal sont observées dans des patches en configuration excisée et en absence de nucléotides et de magnésium (Forestier et al., 1993,1996). De plus, nos résultats démontrent que le cromakalim (SR47063) et

le pinacidil (P1075) activent encore des canaux mutés au niveau des résidus catalytiques des NBD.

Sans remettre en cause l'hypothèse du transport des ouvreurs potassiques, il est fort probable que les ouvreurs n'agissent pas tous de la même façon. Ainsi l'action du cromakalim et du pinacidil est indépendante de toute hydrolyse d'ATP, tandis que le diazoxide et le rilmakalim (HOE234) nécessitent des NBD fonctionnels. Cette interaction NBD-ouvreurs pourrait être de deux natures, soit l'hydrolyse de l'ATP ou la présence d'ADP influence l'action des ouvreurs, soit au contraire, la fixation des ouvreurs induit l'hydrolyse de l'ATP (comme lors des transports), l'ensemble conduisant à l'activation des canaux  $K_{ATP}$ . Il est possible que ces deux mécanismes co-existent dans le récepteur des sulfonylurées, le premier s'appliquant au diazoxide et autres, et le deuxième s'appliquant au cromakalim et pinacidil.

Pour tester ces hypothèses, nous aimerions mettre au point des expériences de saturation de site avec des molécules photoactivables afin de déterminer quel partenaire doit être fixé en premier pour permettre l'action de l'autre (fixation de l'ADP ou de l'ouvreur en premier).

A noter que la perte totale de l'activation du double mutant SUR2A G805D-G1442D par les ouvreurs, même le cromakalim et le pinacidil, est certainement due à une déstabilisation totale de la structure des NBD. En effet, les simples mutations G805D et G1442D n'ont qu'un effet mineur sur l'action de ces ouvreurs, et l'association des deux mutations abolit totalement toute activation. Ainsi, si ces glycines situées dans la région "linker" des NBD sont proches spatialement, la double mutation en aspartate chargé négativement, crée une répulsion de charge très forte qui pourrait éloigner les deux NBD et par effet indirect, modifier toute la structure du récepteur des sulfonylurées.

Autre point, les différents mutants de SUR2A au niveau des NBD semblent être moins sensibles au P1075. Ce phénomène semble lié en apparence à la perte de sensibilité des mutants à l'ADP. En effet, lorsque le mutant est toujours sensible à l'ADP, 10 $\mu$ M de P1075 suffisent pour atteindre le maximum d'activation. L'action de cet ouvreur, même si elle n'est pas MgADP dépendante, doit certainement être liée à ce nucléotide pour accroître son effet ou augmenter sa constante d'association sur le récepteur des sulfonylurées. Seule curiosité restante, le mutant K707A et le double mutant associé qui abolissent totalement tout effet du P1075.

Dernière remarque sur les NBD, la température joue probablement un rôle primordial dans nos mesures puisque les canaux  $K_{ATP}$  recombinants que nous utilisons sont issus de mammifères et ont par conséquent une activité optimale à 37°C. Il est fort possible que la réactivité des canaux  $K_{ATP}$  aux nucléotides soit bien plus rapide *in vivo* que lors de nos expériences de patch clamp. Ainsi, il faut rester prudent lors d'associations avec d'autres transporteurs ABC ayant des températures optimales différentes, tel que YCF1 endogène chez les levures (température optimale de croissance : 30°C) ou des transporteurs de plantes, de bactéries non mésophiles... Les caractéristiques des effecteurs peuvent s'en trouver légèrement modifiées par rapport aux conditions physiologiques, la température agissant à la fois sur les constantes de dissociation des effecteurs, sur le potentiel d'équilibre des ions et sur l'activité ATPases des NBDs.

### **7.3. Modèle à activation constante**

Ce modèle est basé non pas sur une insensibilité de SUR1 aux ouvreurs mais au contraire à une activation constante de cette isoforme. Pour bien comprendre ce qu'il en est, il faut rassembler tous les éléments qui différencient les isoformes entre elles et les présumés mécanismes de régulation par les ouvreurs et les nucléotides.

Ce dont nous sommes certains, c'est que les canaux contenant SUR1 sont activés spécifiquement par le diazoxide, et que ceux contenant SUR2A le sont également mais uniquement en présence de quantités suffisantes de MgADP. Étrangement, le diazoxide est le seul ouvreur agissant sur SUR1.

D'autre part, il semble impossible, dans les conditions physiologiques, que les canaux  $K_{ATP}$  soient activés en relation directe avec les concentrations intracellulaires de MgADP, qui est pourtant l'activateur endogène. En effet, le MgADP à 100  $\mu$ M (concentration induisant une activation en mode excisé) ne serait pas suffisant pour activer les canaux  $K_{ATP}$  dans un environnement contenant plusieurs millimolaires d'ATP. A des concentrations supérieures, l'ADP devient inhibiteur en se fixant sur Kir6.2. Bienengraeber et al., 1999, proposent un modèle extrêmement intéressant basé non pas sur les concentrations d'ATP et d'ADP, mais sur des états du récepteur des sulfonylurées. En effet, ils distinguent l'état MgATP lié de l'état MgADP lié, le premier étant inhibiteur et le deuxième activateur. Ils mettent également en évidence l'activité ATPase des NBD, ce qui signifie que même en présence de grandes quantités d'ATP intracellulaire, celui-ci se fixe sur les NBD et notamment le NBD2 qui

en hydrolysant l'ATP, produit du MgADP pouvant rester dans son site et configurer la sous-unité SUR en état MgADP lié activateur du canal.

De plus, de fortes présomptions laissent supposer que les ouvreurs potassiques seraient des substrats du récepteur des sulfonylurées et que leur transport induirait des changements conformationnels activant l'ouverture du canal (Zingman et al., 2001). Ainsi les ouvreurs pourraient être un des facteurs provoquant l'hydrolyse de MgATP au niveau du NBD2 et/ou empêchant le relargage de MgADP de son site, source d'activation des canaux  $K_{ATP}$ .

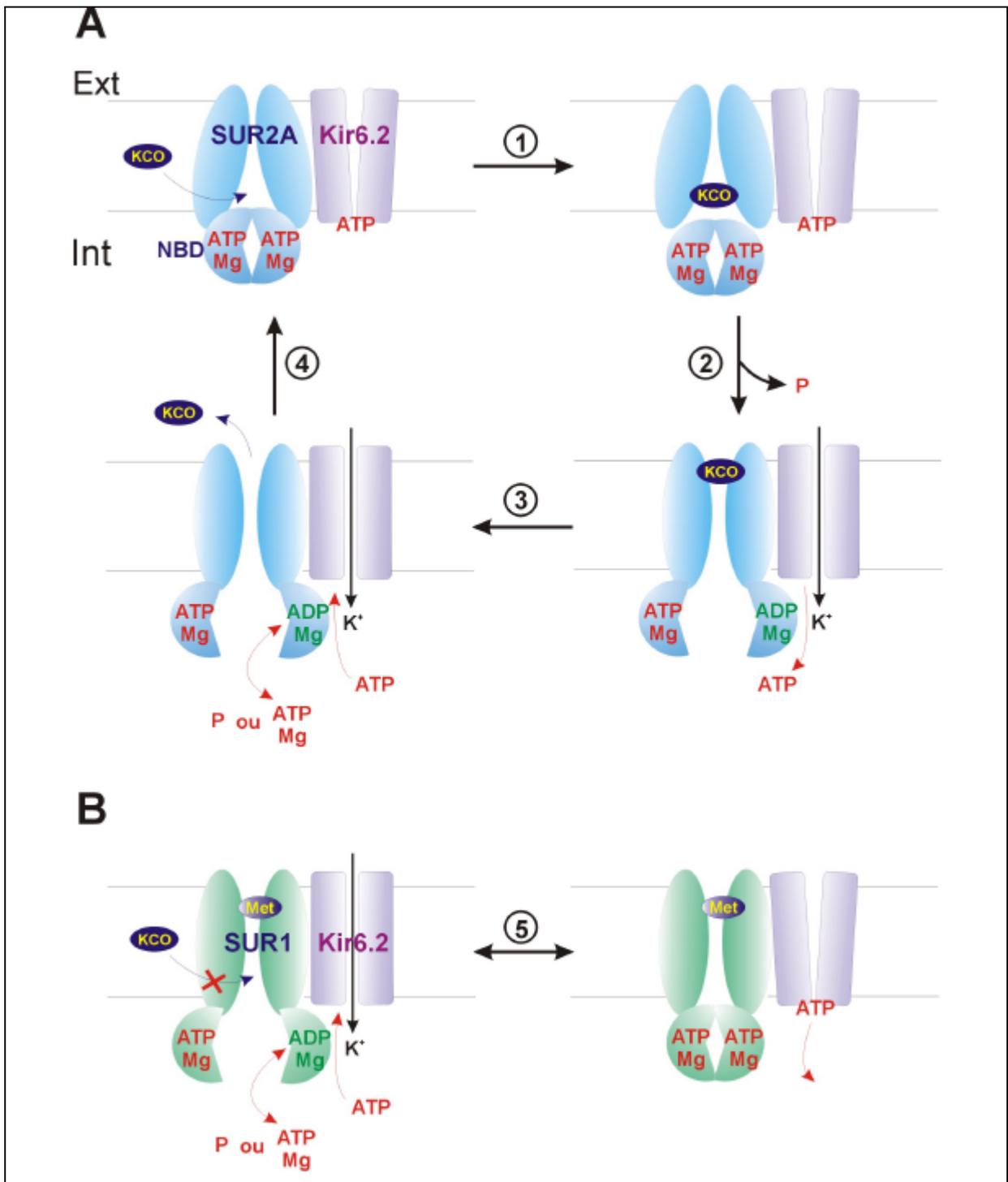
Mais le plus important est la différence de rôle physiologique entre SUR1 et SUR2A. Dans le premier cas, la fermeture des canaux pancréatiques (SUR1/Kir6.2) induit une dépolarisation membranaire activant des canaux calciques voltage-dépendants puis la sécrétion d'insuline. Dans le deuxième cas, l'ouverture des canaux cardiaques contenant SUR2A/Kir6.2 permet de protéger les muscles cardiaques en cas d'hypoxie ou contre une surexcitation. En d'autres termes, dans les conditions "normales" ou homéostasiques de glycémie ou de fonctionnement du système cardiaque, les canaux contenant SUR1 doivent être constamment ouverts et ceux contenant SUR2A, constamment fermés !

D'où mon hypothèse selon laquelle SUR1 adopterait une configuration MgADP lié de façon très fréquente voire constante. En partant de l'hypothèse que SUR1 fut un transporteur qui a perdu sa fonction première pour devenir une protéine entièrement vouée à la régulation de la sous-unité canal, nous pouvons imaginer qu'elle a conservé sa capacité à hydrolyser l'ATP comme pour transporter un substrat tel que les ouvreurs potassiques, ce transport pouvant être encore effectué par SUR2A. Mais dans le cas de SUR1, le cycle : fixation de MgATP et du substrat, hydrolyse, transport, libération du substrat puis du MgADP (Figure 43A), serait bloqué au niveau de la libération du substrat, signifiant que la protéine resterait en état MgADP lié (activateur) tant que le substrat n'est pas sorti de son site. Ainsi, lors de l'évolution, SUR1 pourrait avoir acquis la possibilité de mimer un substrat dans son site grâce à la mutation de certains résidus telle que la méthionine1290. Son caractère encombrant et hydrophobe mimerait une partie importante des substrats ou bloquerait le site en configuration substrat-lié.

Ce modèle expliquerait ainsi de nombreuses caractéristiques de SUR1, à commencer par (i) son activation fréquente nécessaire pour inhiber la sécrétion d'insuline en condition de glycémie normale ; (ii) il expliquerait également l'action du

diazoxide sur SUR1 en absence de MgADP. En effet, le diazoxide n'agit sur SUR2A qu'en présence de MgADP, et uniquement si le NBD2 est fonctionnel (site de fixation du MgADP). Ainsi l'action du diazoxide sur SUR1 serait due à la configuration MgADP lié que cette protéine aurait en permanence en présence de MgATP ou MgADP ; (iii) l'absence de nouveaux ouvreurs capables d'agir sur SUR1 serait due au blocage du site de fixation des ouvreurs-substrats par la méthionine soit stériquement soit conformationnellement. Ce blocage mimerait leur présence ou action, les rendant inefficaces sur SUR1, mais toujours actifs sur SUR2A. Ceci signifierait qu'il faudrait recentrer la recherche sur de nouveaux ouvreurs dans la même classe que le diazoxide dont la structure est proche de celle des sulfonylurées-bloqueurs, et que l'affinité des nouveaux produits devra être plus importante que celle de SUR1 pour le diazoxide et avec moins de dépendance vis-à-vis de MgADP. Nous obtiendrions alors des agents thérapeutiques n'induisant pas ou peu d'effets sur SUR2A.

Cette hypothèse peut être schématisée avec la méthionine de SUR1 comme substrat intrinsèque ou comme pilier pour maintenir le site en configuration substrat lié (Figure 43).



**Figure 43 :** Modèle du substrat-lié constant pour SUR1.

**A)** Partant de l'hypothèse selon laquelle les ouvreurs (KCO : K<sup>+</sup> channel openers) sont des substrats du récepteur des sulfonylurées, le cycle de transport serait schématisé ainsi : **1)** fixation du substrat ; **2)** l'hydrolyse du MgATP du NBD2 induit un changement conformationnel (état ADP-lié) qui permet le transport du substrat tout en activant l'ouverture du canal ; **3)** le substrat quitte son site, libérant le MgADP du NBD2 remplacé par du MgATP plus abondant dans le cytoplasme ; **4)** retour à l'état initial. **B)** Le modèle proposé pour SUR1 correspond à un état permanent en configuration substrat-lié grâce à la méthionine 1290 qui mimerait le substrat, empêchant ainsi la fixation des ouvreurs. La fixation du MgADP sur le NBD2 serait stabilisée dans cette conformation, mais pas de façon permanente d'où la transition **5)**.

Toutefois, certaines données remettent en cause certains aspects de ce modèle, à commencer par (i) la forte affinité de SUR1 pour l'ATP dont le  $K_i$  est proche de  $10\mu\text{M}$ . Si comme dans le modèle proposé, SUR1 était constamment en configuration MgADP lié, les canaux devraient être moins sensibles à l'ATP et ouverts en permanence, or ce n'est pas le cas. Néanmoins, les mesures de  $K_i$  ont été réalisées en configuration excisé "inside-out", ce qui signifie un lavage continu de la protéine par des solutions d'ATP, favorisant la dissociation du MgADP fixé sur le NBD2. Dans les cellules, le milieu est moins mouvementé que les flux appliqués directement sur les pipettes de patch. De plus, les mesures en patch clamp excisé se font à température ambiante ( $\sim 21^\circ\text{C}$ ), relativement éloignée de la température optimale d'activité ATPase des NBD qui est de  $37^\circ\text{C}$ . Ils seraient par conséquent moins efficaces pour hydrolyser MgATP en MgADP dont la constante d'association doit être également modifiée par rapport aux conditions *in vivo*. Tous ces artéfacts expérimentaux liés à la technique des patchs excisés pourraient expliquer cette sensibilité forte pour l'ATP ; (ii) Autre point de controverse, si la protéine était constamment en configuration MgADP lié, il semble difficile de pouvoir activer davantage les canaux  $K_{\text{ATP}}$  avec l'ADP. Pourtant, l'ajout de  $100\mu\text{M}$  de MgADP dans les expériences de patch clamp active les canaux  $K_{\text{ATP}}$  SUR1/Kir6.2 recombinants. Le fait que SUR1 soit également activable par MgADP, alors que le NBD2 devrait déjà en fixer et donc être non "suractivable" par la même molécule, peut s'expliquer par une dissociation plus faible du MgADP en présence de solution en contenant. Ceci correspond à un lavage moins important et donne donc une impression d'activation, qui correspondrait en fait à une plus faible perte d'activation.

(iv) Dernier point contradictoire, et non des moindres : les caractéristiques pharmacologiques de SUR2B sont communes avec celles de SUR1 et de SUR2A, alors que la seule différence entre SUR2A et SUR2B sont les 42 résidus Cterminaux, bien loin dans la structure primaire des résidus de l'hélice 17. Comment ce domaine, en apparence cytoplasmique, peut-il conférer à SUR2B la capacité d'être activé à la fois par le diazoxide sans co-activateur et par les ouvreurs antihypertensifs ? La réponse la plus vraisemblable est que cette région pourrait interagir directement avec le NBD2 et modifier la constante de dissociation du MgADP de telle façon que cette molécule reste plus longtemps dans son site. Cela conférerait à SUR2B une configuration MgADP lié de manière bien plus fréquente que SUR2A et par conséquent la capacité d'être activée à la fois par le diazoxide sans co-activateur,

mais également par les autres ouvreurs puisque la position stratégique de l'hélice 17 (Thr1253) est un résidu peu encombrant dans SUR2A et SUR2B.

Pour vérifier ce modèle, nous pourrions contrebalancer le lavage, en patches excisés, du MgADP fixé sur le NBD, en greffant de manière permanente de l'ADP-azido sur SUR1. Il suffirait ensuite de faire une gamme d'inhibition à l'ATP dans de telles conditions, pour déterminer si les canaux en configuration MgADP lié sont activables dans des conditions physiologiques (3 à 6mM d'ATP). De plus, en réalisant les mêmes expériences sur SUR2A et SUR2B, nous pourrions en déterminer les conséquences sur l'action du diazoxide. L'activation deviendra-t-elle du même ordre de grandeur que celle observée sur SUR1 dans les mêmes conditions et en absence d'ADP ?

A plus long terme, et dans le cas de purifications réussies de SUR1, SUR2A, SUR2B et Kir6.2, nous pourrions réaliser des mesures de fluorescence intrinsèque qui nous indiqueraient toute modification conformationnelle des protéines, et notamment, tout mouvement de l'hélice 17, riche en résidus aromatiques. En comparant les données entre les types sauvages et les mutants répondant différemment aux ouvreurs, nous saurions s'ils agissent dans cette région et de quelle manière.

# **CONCLUSION**

## 8. CONCLUSION

Ce travail a mis en évidence deux aspects de la régulation des canaux  $K_{ATP}$  :

1) Le premier est la relation étroite entre l'action des ouvreurs potassiques et l'activité des domaines de liaison des nucléotides. Cette relation est flagrante dans le cas du diazoxide dont l'effet activateur n'est observable sur l'isoforme cardiaque qu'en présence de MgADP. Les mutations des résidus catalytiques potentiels du NBD2 (site de fixation principal du MgADP), abolissent tout effet du diazoxide sur SUR2A. Cependant cette dépendance vis-à-vis des nucléotides n'est pas identique entre tous les ouvreurs comme l'ont démontré les résultats des mutants ponctuels simples et doubles des NBD de SUR2A. Certains ouvreurs tels que le cromakalim (SR47063) et le pinacidil (P1075) ne sont pas ou peu dépendants de la fonctionnalité des NBD, tandis que l'activation par le diazoxide et le rilmakalim (HOE234) y sont fortement sensibles. Ces résultats pourraient s'expliquer par les travaux réalisés en collaboration avec le laboratoire du Pr André Terzic, qui démontrèrent l'activité ATPase des NBD et la corrélation entre cette activité et l'effet de certains ouvreurs tels que le rilmakalim. Ces données renforcent l'hypothèse selon laquelle les ouvreurs seraient des substrats du récepteur des sulfonylurées.

2) Le deuxième est la détermination des résidus impliqués dans la spécificité pharmacologique des isoformes pancréatiques et cardiaques. L'approche chimérique, puis la création de mutants ponctuels caractérisés par la technique du patch-clamp ont révélé de manière surprenante qu'un seul résidu de l'hélice 17 de SUR2A, introduit en lieu et place dans l'hélice 17 de SUR1, était suffisant pour conférer la sensibilité de cette dernière aux ouvreurs potassiques antihypertensifs, ce résidu étant soit la leucine 1249 (SUR2A), soit la thréonine 1253 (SUR2A). De plus ces résidus sont également nécessaires pour l'action de ces ouvreurs, puisque leur mutation dans SUR2A abolit leur action. Les derniers résultats obtenus sur différents mutants de SUR2A, permettent de conclure que la thréonine 1253 ne crée pas de liaisons directes avec les ouvreurs, mais que l'élément essentiel à leur action est plutôt un faible encombrement de la chaîne latérale du résidu 1253 de SUR2A ou 1290 de SUR1, sans condition d'hydrophobicité ou de polarité du résidu.

Pour expliquer ces résultats pour le moins surprenants, nous discutons sur différentes hypothèses basées sur la formation d'un site de liaison peu spécifique

pouvant expliquer la diversité structurale des ouvreurs potassiques, mais également sur des hypothèses plus originales fondées sur la possible interaction de cette région avec la sous-unité canal (Kir6.2), et la différence de sensibilité à l'ATP des configurations liées à SUR ou non de Kir6.2.

En dernière partie, nous proposons un modèle très original élaboré à partir de nos derniers résultats et des rôles physiologiques distincts entre l'isoforme pancréatique et l'isoforme cardiaque.

De nouvelles expériences permettront de valider ou non ces hypothèses et modèles, et nous conduire vers une meilleure compréhension de la régulation endogène et pharmacologique des canaux  $K_{ATP}$ . Cette étape nécessaire à l'élaboration éventuelle de nouveaux ouvreurs plus spécifiques, pourra également être extrapolée à d'autres transporteurs ABC très homologues au récepteur des sulfonylurées, mais plus difficilement caractérisables. Ces transporteurs, actuellement étudiés dans le laboratoire de Michel Vivaudou, sont le transporteur de cadmium levurien YCF1 et la protéine de résistance aux anticancéreux MRP1.

Les progrès sont très rapides dans ce domaine de recherche, comme en atteste la publication récente de la structure d'un transporteur ABC (MsbA), et il n'est pas aberrant de croire que nous comprendrons le mécanisme complexe de ces protéines dans un avenir proche.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## A

- Aguilar-Bryan L; Nichols CG; Wechsler SW; Clement IV JP, Boyd III AE, Gonzales G; Herrera-Sosa H; Nguy K; Bryan J; Nelson DA (1995). "Cloning of the Cell High-Affinity Sulfonylurea Receptor : A Regulator of Insulin Secretion". *Science* **268** : 423-426.
- Alekseev AE, Brady P, Terzic A (1998). "Ligand-insensitive state of cardiac ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels-basis for channel opening". *J. Gen. Physiol.* **111** : 381-394
- Alekseev AE, Kennedy ME, Navarro B, Terzic A (1997). "Burst kinetics of co-expressed Kir6.2/SUR1 clones : comparison of recombinant with native ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel". *J. Membr. Biol.* **159** : 161-168
- Allard B, Fournet G, Rougier O, Descans B, Vivaudou M (1995). "Dose-dependent activation and block by bisG10, a K<sup>+</sup> channel blocker, of mouse and frog skeletal muscle KATP channels". *FEBS Lett.* **375** : 215-219
- Ammala C, Moorhouse A, Ashcroft FM (1996). "The sulfonylurea receptor confers diazoxide sensitivity on the inward rectifying K<sup>+</sup> channel Kir6.1 expressed in human embryonic kidney cells". *J. Physiol.* **494** : 709-714
- Amoroso S, Schmid-Antomarchi H, Fosset M, Lazdunski M (1990). "Glucose, sulfonylureas and neurotransmitter release : Role of ATP-sensitive potassium channels". *Science* **247** : 852-854
- Arena JP, Kass RS (1989). "Activation of ATP-sensitive K channels in heart cells by pinacidil : Dependence on ATP". *Am. J. Physiol.* **257** : H2092-H2096
- Arkhammar P, Nilsson T, Rorsman P, Berggren PO (1987). "Inhibition of ATP-regulated K<sup>+</sup> channels precedes depolarisation induced increase in cytoplasmic free Ca<sup>2+</sup> concentration in pancreatic  $\beta$  cells". *J. Biol Chem.* **262** : 5448-5454
- Ashcroft FM (1996). "Mechanisms of the glycaemic effects of sulfonylureas". *Horm. Metab. Res.* **28** : 456-463
- Ashcroft FM (1988a). "Adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channels". *Annu. Rev. Neurosci.* **11** : 97-118
- Ashcroft FM (2000). "Ion Channels and Disease". Ed. Academic Press.
- Ashcroft FM, Ashcroft SJH, Harrison DE (1988b). " Properties of single potassium channels modulated by glucose in rat pancreatic  $\beta$ -cells". *J. Physiol.* **400** : 501-527
- Ashcroft FM, Harrison DE, Ashcroft SJH (1984). "Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic  $\beta$ -cells". *Nature* **312** : 446-448
- Ashcroft FM, Kakei M (1989). "ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in rat pancreatic beta-cells : modulation by ATP and Mg<sup>2+</sup> ions". *J. Physiol.* **416** : 349-367
- Ashcroft FM, Kakei M, Kelly RP, Sutton R (1987). "ATP-sensitive K channel in isolated human pancreatic  $\beta$ -cells". *FEBS Lett.* **215** : 9-12

- Ashcroft SJH, Ashcroft FL (1992). "The sulfonylurea receptor". *Biochim Biophys. Acta* **1175** : 45-49
- Ashford MLJ, Sturgess NC, Trout NJ, Gardner NJ, Hales CN (1988). "Adenosine-5'-Triphosphate-sensitive ion channels in neonatal rat cultured central neurones". *Pflügers Arch.* **412** : 297-304
- Atwal KS (1994). "Pharmacology and structure-activity relationships for KATP modulators : tissue-selective K<sub>ATP</sub> openers". *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **24** : S12-S17

## B

- Baukrowitz T, Schulte U, Oliver D, Herlitze T, Tucker SJ, Ruppersberg JP, Fakler B (1998). "PIP<sub>2</sub> and PIP as determinants for ATP inhibition of K<sub>ATP</sub> channels". *Science* **282** : 1141-1144
- Baukrowitz T, Tucker SJ, Schulte U, Benndorf K, Ruppersberg JP, Fakler B (1999). "Inward rectification in KATP channels : a pH switch in the pore". *EMBO J.* **18** : 847-853
- Beguín P, Nagashima K, Nishimura M, Gonoï T, Seino S (1999). "PKA-mediated phosphorylation of the human K(ATP) channel : separate roles of Kir6.2 and SUR1 subunit phosphorylation". *EMBO J.* **18** : 4722-4732
- Belinsky MG, Bain LJ, Balsara BB, Testa JR, Kruh GD (1998). "Characterization of MOAT-C and MOAT-D, new members of the MRP/cMOAT subfamily of transporter proteins". *J. Natl. Cancer Inst.* **90** : 1735-1741
- Bell GI, Kayano T, Buse JB, Burant CF, Takeda J, Lin D, Fukumoto H, Seino S (1990). "Molecular Biology of mammalian glucose transporters". *Diabetes Care* **13** : 198-208
- Bernardi H, De Weille JR, Epelbaum J, Mourre C, Amoroso S, Slama A, Fosset M, Lazdunski M (1993). "ATP-modulated K<sup>+</sup> channels sensitive to antidiabetic sulfonylureas are present in adenohipophysis and are involved in growth hormone release". *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **90** :1340-1344
- Bienengraeber M, Alekseev AE, Abraham MR, Carrasco A, Moreau C, Vivaudou M, Dzeja PP, Terzic A (2000). "ATPase activity of the sulfonylurea receptor : a catalytic function for the KATP channel complex". *FASEB J.* **14** : 1943-1952
- Bohm A, Diez J, Diederichs K, Welte W, Boos W (2002). "Structural model of MalK, the ABC subunit of the maltose transporter of Escherichia coli : Implications for mal gene regulation, inducer exclusion and subunit assembly". *J. Biol. Chem.* **277** : 3708-3717
- Bolino A, Seri M, Caroli F, Eubanks J, Srinivasan J, Mandich P, Schenone A, Quattrone A, Romeo G, Catterall WA, Devoto M (1998). "Exclusion of the SCN2B gene as candidate for CMT4B". *Eur J Hum Genet.* **6** : 629-634
- Burgess DL, Kohrman DC, Galt J, Plummer NW, Jones JM, Spear B, Meisler MH (1995). "Mutation of a new sodium channel gene, Scn8a, in the mouse mutant "motor endplate disease". *Nature Genet.* **10** : 461-465

## C

- Capener CE, Shrivastava IH, Ranatunga KM, Forrest LR, Smith GR, Sansom MS (2000). "Homology modeling and molecular dynamics simulation studies of an inward rectifier potassium channel". *Biophys J.* **78** : 2929-2942

- Chang G, Roth CB (2001). "Structure of MsbA from *E. coli* : a homog of the Multidrug Resistance ATP Binding Cassette (ABC) transporters". *Science* **293** : 1793-1800
- Cheng SH, Rich DP, Marshall J, Gregory RJ, Welsh MJ, Smith AE (1991). "Phosphorylation of the R domain by cAMP-dependent protein kinase regulates the CFTR chloride channel". *Cell*, **66**, 1027-1036
- Clement JP IV, Kunjilwar K, Gonzalez G, Schwanstecher M, Panten U, Aguilar-Bryan L, Bryan J (1997). "Association and stoichiometry of KATP channel subunits". *Neuron* **18** : 827-838
- Cook DL, Hales CN (1984). "Intracellular ATP directly blocks K<sup>+</sup> channels in pancreatic  $\beta$ -cells". *Nature* **311** : 271-273
- Cook DL, Satin LS, Ashford MLJ, Hales CN (1988). "ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in pancreatic  $\beta$ -cells". *Diabetes* **37** : 495-498
- Crouzy S, Berneche S, Roux B (2001). "Extracellular blockade of K(+) channels by TEA : results from molecular dynamics simulations of the KcsA channel". *J Gen Physiol.* **118** : 207-218

## D

- Daut J, Maier-Rudolph W, von Beckerath N, Mehrke G, Gunther K, Goedel-Meinen L (1990). "Hypoxic dilation of coronary arteries is mediated by ATP-sensitive potassium channels". *Science* **247** : 1341-1344
- Davidson AL, Laghaeian SS, Mannering DE (1996). "The maltose transport system of *Escherichia coli* displays positive cooperativity in ATP hydrolysis". *J Biol Chem.* **271** : 4858-4863
- Davies NW, Standen NB, Stanfield PR (1991). "ATP-dependent potassium channels of muscle cells : Their properties, regulation, and possible functions". *J. Bioenerg. Biomembr.* **23** : 509-535
- De Waard M, Liu H, Walker D, Scott VES, Gurnett CA, Campbell KP (1995). "Properties of the  $\alpha_1\beta$  anchoring site in voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels". *J. Biol. Chem.* **270** : 12056-12064
- de Weille J, Schmid-Antomarchi H, Fosset M, Lazdunski M (1988). "ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels that are blocked by hypoglycemia-inducing sulfonylureas in insulin-secreting cells are activated by galanin, a hyperglycemia-inducing hormone". *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **85** : 1312-1316
- de Weille JR, Schmid-Antomarchi H, Fosset M, Lazdunski M (1989). "Regulation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in insulinoma cells : activation by somatostatin and protein kinase C and the role of camp". *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **86** : 2971-2975
- Deutsch N, Klitzner TS, Lamp ST, Weiss JN (1991). "Activation of cardiac ATP-sensitive K<sup>+</sup> current during hypoxia : correlation with tissue ATP levels". *Am. J. Physiol.* **261** : H671-H676
- Deutsch N, Matsuoka S, Weiss JN (1994). "Surface charge and properties of cardiac ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels". *J Gen Physiol.* **104** : 773-800
- D'hahan N, Jacquet H, Moreau C, Catty P, Vivaudou M (1999). "A transmembrane domain of the sulfonylurea receptor mediates activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels by K<sup>+</sup> channels openers". *Mol. Pharmacol.* **56** : 308-315

- D'hahan N, Moreau C, Prost AL, Jacquet H, Alekseev AE, Terzic A, Vivaudou M (1999). "Pharmacological plasticity of cardiac ATP-sensitive potassium channels toward diazoxide revealed by ADP". *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **96** : 12162-12167
- Diederichs K, Diez J, Greller G, Muller C, Breed J, Schnell C, Vonrhein C, Boos W, Welte W (2000). "Crystal structure of MalK, the ATPase subunit of the trehalose/maltose ABC transporter of the archaeon *Thermococcus litoralis*". *EMBO J.* **19** : 5951-5961
- Djeza PP, Terzic A (1998). "Phosphotransfer reactions in the regulation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels". *FASEB J.* **12** : 523-529
- Doring F, Derst C, Wischmeyer E, Karschin C, Schneggenburger R, Daut J, Karschin A (1998). "The epithelial inward rectifier channel Kir7.1 displays unusual K<sup>+</sup> permeation properties". *J Neurosci.* **18** : 8625-8636
- Doring F, Karschin A (2000). "Genomic structure and promoter analysis of the rat kir7.1 potassium channel gene (Kcnj13)". *FEBS Lett.* **483** : 93-98
- Doyle DA, Cabral JM, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R (1998). "The structure of the potassium channel : Molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity". *Science* **280** : 69-77
- Dubois JM (1999). "Les canaux ioniques cellulaires". ed. ECONOMICA
- Dunne MJ, Bullet MJ, Li G, Wollheim CB, Petersen OH (1989). "Galanin activates nucleotide-dependent K<sup>+</sup> channels in insulin-secreting cells via a pertussis toxin-sensitive G-protein". *EMBO J.* **8** : 413-420
- Dunne MJ, Petersen OH (1986a). "GTP and GDP activation of K<sup>+</sup> channels that can be inhibited by ATP". *Pflügers Arch.* **407** : 564-565
- Dunne MJ, Petersen OH (1986b). "Intracellular ADP activates K<sup>+</sup> channels that are inhibited by ATP in insulin-secreting cell line". *FEBS Lett* **208** : 58-62

## E

- Elvir-Mairena JR, Jovanovic A, Gomez LA, Alekseev AE, Terzic A (1996). "Reversal of the ATP-liganded state of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels by adenylate kinase activity". *J. Biol. Chem.* **271** : 31903-31908
- Escande D, Thuringer D, Leguern S, Caverio I (1988). "The potassium channel opener cromakalim (BRL34915) activates ATP-dependent K<sup>+</sup> channels in isolated cardiac myocytes". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **154** : 620-625

## F

- Findlay I, Dunne M (1986). "ATP maintains ATP-inhibited K<sup>+</sup> channels in an operational state". *Pflügers Arch.* **407** : 238-240
- Findlay I, Dunne MJ, Petersen OH (1985). "ATP-sensitive inward rectifier and voltage- and calcium activated K<sup>+</sup> channels in cultured pancreatic islet cells". *J. Memb. Biol.* **88** : 165-172
- Forestier C, Depresle Y, Vivaudou M (1993). "Intracellular protons control the affinity of skeletal muscle ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels for potassium-channel-openers". *FEBS Lett.* **325** : 276-280
- Forestier C, Pierrard J, Vivaudou M (1996). "Mechanism of action of K<sup>+</sup> channel openers on skeletal muscle KATP channels : Interactions with nucleotides and protons". *J. Gen. Physiol.* **107** : 489-502.

- Forestier C, Vivaudou M (1993a). "Modulation by Mg<sup>2+</sup> and ADP of ATP-sensitive potassium channels in frog skeletal muscle". *J. Membr. Biol.* **132** : 87-94.
- Forestier C, Vivaudou M (1993b). "Nucleotide regulation of ATP-sensitive potassium channels of frog skeletal muscle". *Biophys. J.* **61** : 382
- Fosset M, de Weille JR, Green RD, Schid-Antomarchi H, Lazdunski M (1988). "Antidiabetic sulfonylureas control action potential properties in heart cells via high affinity receptors that are linked to ATP-dependent K<sup>+</sup> channels". *J Biol Chem.* **263** : 7933-7936

## G

- Gaudet R, Wiley DC (2001). "Structure of the ABC ATPase domain of human TAP1, the transporter associated with antigen processing". *EMBO J.* **20** : 4964-4972
- George A L, Ledbetter DH, Kallen RG, Barchi RL (1991). "Assignment of a human skeletal muscle sodium channel  $\alpha$ -subunit gene (SCN4A) to 17q23.1-25-3". *Genomics* **9** : 555-556
- George AL, Varkony TA, Drabkin HA, Han J, Knops JF, Finley WH, Brown GB, Ward DC, Haas M (1995). "Assignment of the human heart tetrodotoxin-resistant voltage-gated Na<sup>+</sup> channel  $\alpha$ -subunit gene (SCN5A) to band 3p21". *Cytogenet. Cell Genet.* **68** : 67-70
- Gopalakrishnan M, Janis RA, Triggle DJ (1993). "ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels : pharmacologic properties, regulation, and therapeutic potential". *Drug Dev. Res.* **28** : 95-127
- Gribble FM, Tucker SJ, Haug T, Ashcroft FM (1998a). "MgATP activates the beta cell KATP channel by interaction with its SUR1 subunit". *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **95** : 7185-7190
- Gribble F, Tucker S, Seino S, Ashcroft F (1998b). "Tissue specificity of sulfonylureas : studies on cloned cardiac and  $\beta$ -cells K<sub>ATP</sub> channels". *Diabetes* **47** : 1412-1418
- Gribble FM, Ashfield R, Ashcroft FM (1999). "Identification of the high affinity tolbutamide site on the SUR1 subunit of the KATP channel". *Diabetes* **48** : 1341-1347
- Gribble FM, Tucker SJ, Ashcroft FM (1997a). "MgATP activates the  $\beta$  cell KATP channel by interaction with its SUR1 subunit". *Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95** : 7185-7190
- Gribble FM, Tucker SJ, Ashcroft FM (1997b). "The essential role of the walker A motifs of SUR1 in K-ATP channel activation by Mg-ADP and diazoxide". *EMBO J.* **16** : 1145-1152
- Gribble FM, Tucker SJ, Ashcroft FM (1997c). "The interaction role of nucleotides with the tolbutamide block of cloned ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel currents expressed in *Xenopus* oocytes : A reinterpretation". *J. Physiol. (London)* **504** : 35-45
- Gros L, Virsolvy A, Salazar G, Bataille D, Blache P (1999). "Characterization of low-affinity binding sites for glibenclamide on the Kir6.2 subunit of the beta-cell KATP channel". *Biochem Biophys Res Commun.* **257** : 766-770
- Guillemare E, Honore E, De Weille J, Fosset M, Lazdunski M, Meisheri K. (1994). "Functional receptors in *Xenopus* oocytes for U-37883A, a novel ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel blocker : comparison with rat insulinoma cells. *Mol Pharmacol.* **46** : 139-45

Gylfe E, Hellman B, Sehlin J, Taljedal IB (1984). "Interaction of the sulphonylurea with the pancreatic  $\beta$ -cell". *Experimentia* **40** : 1126-1134

## H

Hambrock A, Löffler-Walz C, Russ U, Lange U, Quast U (2001). "Characterisation of a mutant Sulfonylurea Receptor SUR2B with High Affinity for Sulfonylureas and Openers : Differences in the Coupling to Kir6.x Subtypes". *Mol Pharmacol.* **60** : 190-199

Hamill O.P., Marty A., Neher E., Sakmann B., and Sigworth F.J. (1981). "Improved Patch-Clamp Techniques for High-Resolution Current Recording from Cells and Cell-Free Membrane Patches". *Pflügers Archiv.* **391** : 85-100

Han J, Lu CM, Brown GB, Rado TA (1991). "Direct amplification of a single dissected chromosomal segment by polymerase chain reaction : a human brain sodium channel gene is on chromosome 2q22-q23". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88** : 335-339

Heron L, Virsolvy A, Peyrollier K, Gribble F, LeCam A, Ashcroft F, Bataille D (1998). "Human  $\alpha$ -endosulfine, a possible regulator of sulfonylurea-sensitive  $K_{ATP}$  channel : Molecular cloning, expression and biological properties". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95** : 8387-8391

Higgins CF (1992). "ABC transporters : From Microorganisms to Man". *Ann. Rev. Cell Biol.* **8** : 67-113

Higgins CF, Linton KJ (2001). "Structural biology. The xyz of ABC transporters". *Science* **293** : 1782-1784.

Hirohashi T, Suzuki H, Sugiyama Y (1999). "Characterization of the transport properties of cloned rat multidrug resistance-associated protein 3 (MRP3)". *J Biol Chem.* **274** : 15181-15185

Hirohashi T, Suzuki H, Takikawa H, Sugiyama Y (2000). "ATP-dependent transport of bile salts by rat multidrug resistance-associated protein 3 (Mrp3)". *J Biol Chem.* **275** : 2905-2910

Ho K, Nichols CG, Lederer WJ, Lytton J, Vassilev PM, Kanazirska MV, Hebert SC (1993). "Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel". *Nature* **362** : 31-38

Hopfner KP, Karcher A, Shin DS, Craig L, Arthur LM, Carney JP, Tainer JA (2000). Structural biology of Rad50 ATPase : ATP-driven conformational control in DNA double-strand break repair and the ABC-ATPase superfamily". *Cell* **101** : 789-800

Horie M, Irisawa H, Noma A (1987). Voltage-dependent magnesium block of adenosine-triphosphate-sensitive potassium channel in guinea-pig ventricular cells. *J. Physiol.* **387** : 251-272

Horton R.M., Hunt H.D., Ho S.N., Pullen J.K. and Pease L.R. (1989). "Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes : gene splicing by overlap extension". *Gene* **77** : 61-68

Hung LW, Wang IX, Nikaido K, Liu PQ, Ames GF, Kim SH (1998). "Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter". *Nature* **396** : 623-624

Hunter M, Giebisch G (1988). "Calcium-activated K-channels of *Amphiuma* early distal tubule : inhibition by ATP". *Pflügers Arch.* **412** : 331-333

## I

- Inagaki N, Gonoi T, Clement J, Wang CZ, Aguilar-Bryan L, Bryan J, Seino S (1996). "A family of sulfonylurea receptor determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels". *Neuron* **16** : 1011-1017
- Inagaki N, Tsuura Y, Namba N, Masuda K, Gonoi T, Horie M, Seino Y, Mizuta M, Seino S (1995a). "Cloning and functional characterization of a novel ATP-sensitive potassium channel ubiquitously expressed in rat tissues, including pancreatic islets, pituitary, skeletal muscle, and heart". *J Biol Chem.* **270** : 5691-5694
- Inagaki N, Gonoi T, Clement JP IV, Namba N, Inazawa J, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L, Seino S, Bryan J (1995b). "Reconstitution of IKATP : an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor". *Science* **270** : 1166-1170
- Inagaki N, Inazawa J, Seino S (1995c). "cDNA sequence, gene structure, and chromosomal localization of the human ATP-sensitive potassium channel, uKATP-1, gene (KCNJ8)". *Genomics* **30** : 102-104
- Inoue I, Nagase H, Kishi K, Higuti T (1991). "ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel in the mitochondrial inner membrane". *Nature* **352** : 244-247
- Ishii TM, Maylie J, Adelman JP (1997). "Determinants of apamin and d-tubocurarine block SK potassium channels". *J. Biol. Chem.* **272** : 23195-23200.
- Isom LL, de Jongh KS, Patton DE, Reber BFX, Offord J, Charbonneau H, Walsh K, Goldin AL, Catterall WA (1992). "Primary structure and functional expression of the  $\beta$ 1-subunit of the rat brain sodium channel". *Science* **256** : 839-842.
- Isomoto S, Kondo C, Yamada M, Matsumoto S, Higashiguchi O, Horio Y, Matsuzawa Y, Kurachi Y (1996). "A novel sulfonylurea receptor forms with BIR (Kir6.2) a smooth muscle type ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels". *J. Biol. Chem.* **271** : 24321-24324
- Ito KI, Olsen SL, Qiu W, Deeley RG, Cole SPC (2001). "Mutation of a single conserved tryptophan in multidrug resistance pratein 1 (MRP1/ABCC1) results in loss of drug resistance and selective loss of organic anion transport". *J. Biol. Chem.* **276** : 15616-15624

## J

- Jedlitschky G, Burchell B, Keppler D (2000). " The multidrug resistance protein 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides". *J Biol Chem.* **275** : 30069-30074
- Jentsch TJ, Steinmeyer K, Schwarz G (1990). "Primary structure of Torpedo marmorata chloride channel isolated by expression cloning in *Xenopus oocytes*". *Nature* **348** : 510-514
- Ji S, George AL, Horn R, Barchi RL (1996). "Voltage-dependent regulation of modal gating in the rat SkM1 sodium channel expressed in *Xenopus oocytes*". *J. Gen. Physiol.* **104** : 625-643
- Jones PA, Tucker SJ, Ashcroft FM (2001). "Multiple sites of interaction between the intracellular domains of an inwardly rectifying potassium channel, Kir6.2". *FEBS Lett.* **508** : 85-89
- Jovanovic A et Terzic A (1995). "Diadenosine-hexaphosphate is an inhibitory ligand of myocardiol ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels". *Eur. J. Pharmacol.* **286** : R1-R2

- Jovanovic A, Jovanovic S, Lorenz E, Terzic A (1998a). "Recombinant cardiac ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel subunits confer resistance to chemical hypoxia-reoxygenation injury". *Circulation* **98** : 1548-1555
- Jovanovic A, Jovanovic S, Mays DC, Lipsky JJ, Terzic A (1998b). "Diadenosine 5', 5'-P<sub>1</sub>, P<sub>5</sub>-pentaphosphate harbors the properties of a signalling molecule in the heart". *FEBS Lett.* **423** : 314-318

## K

- Takei M et Noma A (1984) "Adenosine 5'-Triphosphate-sensitive single potassium channel in the atrioventricular node cell of the rabbit heart. *J Physiol* **352** : 265-284
- Takei M, Noma A, Shibasaki T (1985). "Properties of adenosine-triphosphate-regulated potassium channels in guinea-pig ventricular cells". *J. Physiol.* **363** : 441-462
- Kim SJ, Kerst G, Schreiber R, Pavenstadt H, Greger R, Hug MJ, Bleich M (2000). "Inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels in the basolateral membrane of rat pancreatic acini". *Pflugers Arch.* **441** : 331-340
- Kirsch M, Baufreton C, Fernandez C, Brunet S, Pasteau F, Astier A, Loisançe DY (1998). "Preconditioning with cromakalim improves long-term myocardial preservation for heart transplantation". *Ann. Thorac. Surg.* **66** : 417-424.
- Klein I, Balász S, Váradi A (1999). "An inventory of the human ABC proteins". *Biochim Biophys Acta.* **1461** : 237-262
- Kofuji P, Davidson N, Lester HA (1995). "Evidence that neuronal G-protein-gated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels are activated by G $\beta\gamma$  subunits and function as heteromultimers". *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **92** : 6542-6546
- Koster JC, Sha Q, Nichols CG (1999). "Sulfonylurea and K(+)-channel opener sensitivity of K(ATP) channels. Functional coupling of Kir6.2 and SUR1 subunits". *J. Gen. Physiol.* **114** : 203-213
- Kramer W, Oekonomopulos R, Punter J, Summ HD (1988). "Direct photoaffinity labeling of the putative sulfonylurea receptor in rat  $\beta$ -cell tumor membranes by [<sup>3</sup>H]glibenclamide". *FEBS Lett.* **229** : 355-359
- Krapivinsky G, Gordon EA, Wickman K, Clapham DE (1995). "The G-protein-gated atrial K<sup>+</sup> channel IKACH is a heteromultimer of two inwardly-rectifying K<sup>+</sup> channel proteins". *Nature* **374** : 135-141
- Krapivinsky G, Medina I, Eng L, Krapivinsky L, Yang Y, Clapham DE (1998). "A novel inward rectifier K<sup>+</sup> channel with unique pore properties". *Neuron* **20** : 995-1005
- Krauter T, Ruppertsberg JP, Baukrowitz T (2001). "Phospholipids as modulators of K(ATP) channels: distinct mechanisms for control of sensitivity to sulphonylureas, K(+) channel openers, and ATP". *Mol Pharmacol.* **59** : 1086-93
- Kreimer DI, Chai KP, Ames GFL (2000). "Nonequivalence of the Nucleotide-Binding Subunits of an ABC transporter, the Histidine Permease, and conformational changes in the membrane complex". *Biochemistry* **39** : 14183-14195
- Kubo Y, Baldwin TJ, Jan YN, Jan LY (1993a). "Primary structure and functional expression of mouse inward rectifier potassium channel". *Nature* **362** : 127-133
- Kubo Y, Reuveny E, Slesinger PA, Jan YN, Jan LY (1993b). "Primary structure and functional expression of a rat G-protein-coupled muscarinic potassium channel". *Nature* **364** : 802-806

Kusaka S, Inanobe A, Fujita A, Makino Y, Tanemoto M, Matsushita K, Tano Y, Kurachi Y (2001). "Functional Kir7.1 channels localized at the root of apical processes in rat retinal pigment epithelium". *J. Physiol.* **531** : 27-36

**L**

Laing NM, Belinsky MG, Kruh GD, Bell DW, Boyd JT, Barone L, Testa JR, Tew KD (1998). "Amplification of the ATP-binding cassette 2 transporter gene is functionally linked with enhanced efflux of estramustine in ovarian carcinoma cells". *Cancer Res.* **58** : 1332-1337

Lederer WJ, Nichols (1989). "Nucleotide modulation of the activity of rat heart ATP-sensitive potassium channels in isolated membrane patches". *J. Physiol.* **419** : 193-211

Lee K, Belinsky MG, Bell DW, Testa JR, Kruh GD (1998). "Isolation of MOAT-B, a widely expressed multidrug resistance-associated protein/canalicular multispecific organic anion transporter-related transporter". *Cancer Res.* **58** : 2741-2747

Lesage F, Fink M, Barhanin J, Lazdunski M, Mattei MG (1995). "Assignment of human G-protein-coupled inward rectifier K<sup>+</sup> channel homolog GIRK3 gene to chromosome 1q21-q23". *Genomics* **29** : 808-809

Levitan IB (1985). "Phosphorylation of ion channels". *J Memb. Biol.* **87** : 177-190

Li ZS, Szczypka M, Lu YP, Thiele DJ, Rea PA (1996). "The yeast cadmium factor protein (YCF1) is a vacuolar glutathione S-conjugate pump". *J. Biol. Chem.* **271** : 6509-6510

Light PE, Bladen C, Winkfein RJ, Walsh MP, French RJ (2000). "Molecular basis of protein kinase C-induced activation of ATP-sensitive potassium channels". *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97** : 9058-9063

Liman ER, Tytgat J, Hess P (1992). "Subunit stoichiometry of a mammalian K<sup>+</sup> channel determined by construction of multimeric cDNAs". *Neuron* **8** : 861-871

Lin YF, Jan YN, Jan LY (2000). "Regulation of ATP-sensitive potassium channel function by protein kinase A-mediated phosphorylation in transfected HEK293 cells". *EMBO J.* **19** : 942-955

Litt M, Luty J, Kwak M, Allen L, Magenis RE, Mandel G (1989). "Localization of a human brain sodium channel gene (SCN2) to chromosome 2". *Genomics* **5** : 204-208

Liu CE, Liu PQ, Ames GF (1997). "Characterization of the adenosine triphosphatase activity of the periplasmic histidine permease, a traffic ATPase (ABC transporter)". *J Biol Chem.* **272** : 21883-21891

Liu PQ, Liu CE, Ames GF (1999). "Modulation of ATPase activity by physical disengagement of the ATP-binding domains of an ABC transporter, the histidine permease". *J Biol Chem.* **274** : 18310-18318

Liu Y, Jurman ME, Yellen G (1996). "Dynamic rearrangement of the outer mouth of a K<sup>+</sup> channel during gating". *Neuron* **16** : 859-867

Liu Y, Sato T, O'Rourke B, Marban E (1998). "Mitochondrial ATP-dependent potassium channels : Novel effectors of cardioprotection?" *Circulation* **97** : 2463-2469

Loo TW, Clarke DM (1999). "Identification of residues in the drug-binding domain of human P-glycoprotein". *J. Biol. Chem.* **274** : 35388-35392

- Lorenz E, Alekseev AE, Krapivinsky GB, Carrasco AJ, Clapham DE, Terzic A (1998). "Evidence for direct physical association between a K<sup>+</sup> channel (Kir6.2) and a ATP-binding cassette protein (SUR1) which affects cellular distribution and kinetic behavior of an ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel". *Mol Cell. Biol.* **18** : 1652-1659
- Lorenz JR, Terzic A (1999). "Physical association between recombinant cardiac ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel subunits Kir6.2 and SUR2A". *J. Mol. Cell. Cardiol.* **31** : 425-434
- Loussouarn G, Pike LJ, Ashcroft FM, Makhina EN, Nichols CG (2001a). "Dynamic sensitivity of ATP-sensitive K(+) channels to ATP". *J Biol Chem.* **276** : 29098-29103
- Loussouarn G, Phillips LR, Masia R, Rose T, Nichols CG (2001b). "Flexibility of the Kir6.2 inward rectifier K(+) channel pore". *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98** : 4227-4732
- Lu C, Halvorsen SW (1997). "Channel activators regulate ATP-sensitive potassium channel (KIR6.1) expression in chick cardiomyocytes". *FEBS Lett.* **412** : 121-125
- Lu Z, MacKinnon R (1994). "Electrostatic tuning of Mg<sup>2+</sup> affinity in an inward-rectifier K<sup>+</sup> channel". *Nature* **371** : 243-254
- Luciani MF, Chimini G (1996). "The ATP binding cassette transporter ABC1, is required for the engulfment of corpses generated by apoptotic cell death". *EMBO J.* **15** : 226-235

## M

- Makita N, Bennett PB, George AL (1994a). "Voltage-gated Na<sup>+</sup> channel  $\beta$ 1 subunit mRNA expressed in adult human skeletal muscle, heart and brain is encoded by a single gene". *J. Biol. Chem.* **269** : 7571-7578
- Makita N, Sloan-Brown K, Weghuis DO, Ropers HH, George AL (1994b). "Genomic organization and chromosomal assignment of the human voltage-gated Na<sup>+</sup> channel  $\beta$ 1 subunit gene (SCN1B)". *Genomics* **23** : 628-634
- Malo MS, Srivastava K, Andresen JM, Chen XN, Korenberg JR, Ingram VM (1994). "Targeted gene walking by low stringency polymerase chain reaction : assignment of a putative human brain sodium channel gene (SCN3A) to chromosome 2q24-31". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91** : 2975-2979
- Martin S, Yule D, Dunne M, Petersen O (1989). "Vasopressin directly closes ATP-sensitive potassium channels evoking membrane depolarization and an increase in the free intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration in insulin-secreting cells". *EMBO J.* **8** : 3595-3599
- Matsuda H, Saigusa A, Irisawa H (1987). "Ohmic conductance through the inwardly rectifying K channel and blocking by internal Mg<sup>2+</sup>". *Nature* **325** :156-159
- McAleer MA, Breen MA, White NL, Matthews N (1999). " pABC11 (also known as MOAT-C and MRP5), a member of the ABC family of proteins, has anion transporter activity but does not confer multidrug resistance when overexpressed in human embryonic kidney 293 cells". *J. Biol. Chem.* **274** : 23541-23548
- McNicholas CM, Guggino WB, Schwiebert EM, Hebert SC, Giebisch G, Egan ME (1996). "Sensitivity of a renal K<sup>+</sup> channel (ROMK2) to the inhibitory sulfonylurea compound glibenclamide is enhanced by coexpression with the ATP-binding

cassette transporter cystic fibrosis transmembrane regulator". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93** : 8083-8088

Melamed-Frank M, Terzic A, Carrasco AJ, Nevo E, Avivi A, Levy AP (2001). "Reciprocal regulation of expression of pore-forming KATP channel genes by hypoxia". *Mol Cell Biochem* **225** : 145-150

Misler DS, Falke LC, Gillis K, McDaniel ML (1986). "A metabolite regulated potassium channel in rat pancreatic  $\beta$ -cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83** : 7119-7123

Misler S, Giebisch G (1992). "ATP-sensitive potassium channels in physiology, pathophysiology, and pharmacology". *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **1** : 21-33

Morais-Cabral JH, Zhou Y, MacKinnon R (2001). " Energetic optimization of ion conduction rate by the K<sup>+</sup> selectivity filter". *Nature* **414** : 37-42

Moreau C, Jacquet H, Prost AL, D'hahan N, Vivaudou M (2000). "The molecular basis of the specificity of action of K(ATP) channel openers". *EMBO J.* **19** : 6644-6651

Morgan TH (1910). "Sex limited inheritance in *Drosophila*". *Science* **32** : 120-122

## N

Nakamura N, Suzuki Y, Ikeda Y, Notoya M, Hirose S (2000). "Complex structure and regulation of expression of the rat gene for inward rectifier potassium channel Kir7.1". *J. Biol. Chem.* **275** : 28276-28284

Nakamura N, Suzuki Y, Sakuta H, Ookata K, Kawahara K, Hirose S (1999). "Inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel Kir7.1 is highly expressed in thyroid follicular cells, intestinal epithelial cells and choroid plexus epithelial cells : implication for a functional coupling with Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase". *Biochem J.* **342** : 329-336

Nasonkin I, Alikasifoglu A, Ambrose C, Cahill P, Cheng M, Sarniak A, Egan M, Thomas PM (1999). "A novel sulfonylurea receptor family member expressed in the embryonic *Drosophila* dorsal vessel and tracheal system". *J Biol Chem.* **274** : 29420-29425

Neher E, Sakmann B (1976). "Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres". *Nature* **260** : 799-802

Nestorowicz A, Inagaki N, Gono T, Schoor KP, Wilson BA, Glaser B, Landau H, Stanley CA, Thornton PS, Seino S, Permutt MA (1997) ."A nonsense mutation in the inward rectifier potassium channel gene, Kir6.2, is associated with familial hyperinsulinism". *Diabetes* **46** : 1743-1748

Nichols CG, Lederer WJ (1991). "Adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in the cardiovascular systems". *Am. J. Physiol.* **261** : H1675-H1686.

Nichols CG, Lopatin AN (1997). "Inward rectifier potassium channels". *Annu. Rev. Physiol.* **59** : 171-191

Nichols CG, Shyng SL, Nestorowicz A, Glaser B, Clement JP IV, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L, Permutt MA, Bryan J (1996). " Adenosine diphosphate as an intracellular regulator of insulin secretion". *Science* **272** : 1785-1787

Noda M, Shimizu S, Tanabe T, Takai T, Kayano T, Ikeda T, Takahashi H, Nakayama H, Kanaoka Y, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H, Raftery MA, Hirose T, Inayama S, Hayashida H, Miyata T, Numa S (1984). "Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence". *Nature* **312** : 121-127

- Noma A (1983). "ATP-regulated K<sup>+</sup> channels in cardiac muscle". *Nature* **305** : 147-148
- Noma A, Shibasaki T (1985). "Membrane current through adenosine-triphosphate-regulated potassium channels in guinea-pig ventricular cells". *J. Physiol.* **363** : 463-480
- Noma A, Shibasaki T (1985a). "Intracellular ATP and cardiac membrane currents". *Ion channels* (Plenum Press) **1** : 183-212
- Notsu T, Tanaka I, Takano M, Noma A (1992). "Blockade of the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel by 5-hydroxydecanoate in guinea pig ventricular myocytes". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **260** : 702-708

## O

- Ohno-Shosaku T, Zunckler B, Trube G (1987). "Dual effects of ATP on K<sup>+</sup> currents of mouse pancreatic  $\beta$ -cells". *Pflügers Arch.* **408** : 133-138
- Okuyama Y, Yamada M, Kondo C, Satoh E, Isomoto S, Shindo T, Horio Y, Kitakaze M, Hori M, Kurachi Y (1998). "The effects of nucleotides and potassium channel openers on the SUR2A/Kir6.2 complex K<sup>+</sup> channel expressed in a mammalian cell line, HEK293T cells". *Pflügers Arch.* **435** : 595-603
- Ookata K, Tojo A, Suzuki Y, Nakamura N, Kimura K, Wilcox CS, Hirose S (2000). "Localization of inward rectifier potassium channel Kir7.1 in the basolateral membrane of distal nephron and collecting duct". *J Am Soc Nephrol.* **11** : 1987-1994
- O'Rourke B, Ramza B, Marban E (1994). "Oscillations of membrane current and excitability driven by metabolic oscillations in heart cells". *Science* **265** : 962-96

## P

- Panten U, Schwantescher M, Schwantescher C (1996). "Sulfonylurea receptors and mechanism of sulfonylurea action". *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **104** : 1-9
- Papazian DM, Schwarz TL, Tempel BL, Jan YN, Jan LY (1987). "Cloning of genomic and complementary DANN from *Shaker*, a putative potassium channel from *Drosophila*". *Science* **237** : 749-753
- Partiseti M, Collura V, Agnel M, Culouscou JM, Graham D (1998). "Cloning and characterization of a novel human inwardly rectifying potassium channel predominantly expressed in small intestine". *FEBS Lett.* **434** : 171-176
- Paucek P, Mironova G, Mahdi F, Beavis A, Woldegiorgis G, Garlid KD (1992). "Reconstitution and partial purification of the glibenclamide-sensitive, ATP-dependent K<sup>+</sup> channel from rat liver and beef heart mitochondria". *J. Biol. Chem.* **267** : 26062-26069
- Potts JF, Regan MR, Rochelle JM, Seldin MF, Agnew WS (1993). "A glial-specific voltage-sensitive Na channel gene maps close to clustered genes for neuronal isoforms on mouse chromosome 2". *Biochem Biophys Res Commun.* **197** : 100-104
- Pragnell M, De Waard M, Mori Y, Tanabe T, Snutch TP, Campbell KP (1994). "Calcium channel beta-subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the alpha 1-subunit". *Nature* **368** : 67-70
- Proks P, Ashcroft FM (1997). "Phentolamine block of KATP channels is mediated by Kir6.2". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94** : 11716-11720

## Q

- Quayle JM, Bonev AD, Brayden JE, Nelson MT (1994). "Calcitonin gene-related peptide activated ATP-sensitive K<sup>+</sup> currents in rabbit arterial smooth muscle via protein kinase A". *J. Physiol.* **475** : 9-13
- Quayle JM, Nelson MT, Standen NB (1997). "ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle". *Physiol. Rev.* **77** : 1165-1232

## R

- Raab-Graham KF, Radeke CM, Vandenberg CA (1994). "Molecular cloning and expression of a human heart inward rectifier potassium channel". *Neuroreport* **5** : 2501-2505.
- Rawn JD (1990). "Traité de Biochimie". Ed. Universitaires.
- Reimann F, Tucker SJ, Proks P, Ashcroft FM (1999). "Involvement of the n-terminus of Kir6.2 in coupling to the sulphonylurea receptor". *J Physiol.* **518** : 325-336
- Ribalet B et Ciani S (1987). "Regulation by cell metabolism and adenine nucleotides of a K channel in insulin-secreting  $\beta$  cell (RINm5F)". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84** : 1721-1725
- Rorsman P, Trube G (1985). "Glucose dependent K<sup>+</sup>-channels in pancreatic  $\beta$ -cells are regulated by intracellular ATP". *Pflügers Arch.* **405** : 305-309

## S

- Sakura H, Ämmälä C, Smith PA, Gribble FM, Ashcroft FM (1995a). "Cloning and functional expression of the cDNA encoding a novel ATP-sensitive potassium subunit expressed in pancreatic,  $\beta$ -cells, brain, heart and skeletal muscle". *FEBS Lett.* **377** : 338-344
- Sakura H, Bond C, Warren-Perry M, Horsley S, Kearney L, Tucker S, Adelman J, Turner R, Ashcroft FM (1995b). "Characterization and variation of a human inwardly-rectifying-K-channel gene (KCNJ6) : a putative ATP-sensitive K-channel subunit". *FEBS Lett.* **367** :193-197
- Sanchez JA, Gonoï T, Inagaki N, Katada T, Seino S (1998). "Modulation of reconstituted ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels by GTP-binding proteins". *J. Physiol.* **507** : 315-324
- Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, Hutchison CA, Slocombe PM, Smith M (1977). "Nucliotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA". *Nature* **265** : 687-695
- Sanguinetti MC, Jiang C, Curran ME, Keating MT (1995). "A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia : HERG encodes the IKR potassium channel". *Cell* **81** : 299-307
- Schmees G, Stein A, Hunke S, Landmesser H, Schneider E (1999). "Functional consequences of mutations in the conserved 'signature sequence' of the ATP-binding-cassette protein Malk". *Eur J Biochem.* **266** : 420-430
- Schmid-Antomarchi H, de Weille J, Fosset M, Lazdunski M (1987a). "The antidiabetic sulphonylurea glibenclamide is a potent blocker of the ATP-modulated K<sup>+</sup> channel in insulin secreting cells". *Biochem Biophys Res Commun.* **146** : 21-25

- Schmid-Antomarchi H, De Weille J, Fosset M, Lazdunski M (1987b). "The receptor for antidiabetic sulfonylureas controls the activity of the ATP-modulated K<sup>+</sup> channel in insulin-secreting cells". *J Biol Chem.* **262** : 15840-15844
- Schwanstecher M, Loser S, Chudziak F, Panten U (1994). "Identification of a 38-kDa high affinity sulfonylurea-binding peptide in insulin-secreting cells and cerebral cortex". *J. Biol. Chem.* **269** : 17768-17771
- Schwanstecher M, Sieverding C, Dorschner H, Gross I, Aguilar-Bryan L, Schwanstecher C, Bryan J (1998). "Potassium channel openers require ATP to bind to and act through sulfonylurea receptors". *EMBO J.* **17** : 5529-5535
- Schwappach B, Zerangue N, Jan YN, Jan LY (2000). "Molecular basis for K(ATP) assembly : transmembrane interactions mediate association of a K<sup>+</sup> channel with an ABC transporter". *Neuron* **26** : 155-167
- Seino S (1999). "ATP-SENSITIVE POTASSIUM CHANNELS : A model of Heteromultimeric Potassium Channel/Receptor Assemblies". *Ann. Rev. Physiol.* **61** : 337-362
- Senior AE, Gadsby DC (1997). "ATP hydrolysis cycles and mechanism in P-glycoprotein and CFTR". *Semin Cancer Biol.* **8** :143-150
- Shechter E (1997). "Biochimie et Biophysique des membranes". Ed. Masson.
- Shibasaki T (1985). "Properties of adenosine-triphosphate-regulated potassium channels in guinea-pig ventricular cells". *J. Physiol.* **363** : 441-462
- Shimura M, Yuan Y, Chang JT, Zhang S, Campochiaro PA, Zack DJ, Hughes BA (2001). "Expression and permeation properties of the K(+) channel Kir7.1 in the retinal pigment epithelium". *J Physiol.* **531** : 329-346
- Shyng SL, Barbieri A, Gumusboga A, Cukras C, Pike L, Davis JN, Stahl PD, Nichols CG (2000). "Modulation of nucleotide sensitivity of ATP-sensitive potassium channels by phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase". *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97** : 937-941
- Shyng SL, Ferrigni T, Nichols CG (1997). "Control of rectification and gating of cloned KATP channels by the Kir6.2 subunit". *J. Gen. Physiol.* **110** : 141-153
- Shyng SL, Nichols CG (1997). "Octameric stoichiometry of the KATP channel complex". *J. Gen. Physiol.* **110** : 655-664
- Shyng SL, Nichols CG (1998). "Membrane Phospholipid control of nucleotide sensitivity of K<sub>ATP</sub> channels". *Science* **282** : 1138-1141
- Spanswick D, Smith MA, Groppi VE, Logan SD, Ashford MLJ (1997). "Leptin inhibits hypothalamic neurons by activation of ATP-sensitive potassium channels". *Nature* **390** : 521-525
- Spruce AE, Standen NB, Stanfield PR (1985) "Voltage-dependent ATP-sensitive potassium channel of skeletal muscle membrane". *Nature* **316** : 736-738
- Spruce AE, Standen NB, Stanfield PR (1987). "Studies on the unitary properties of adenosine-5'-triphosphate-regulated potassium channels of frog skeletal muscle. *J. Physiol.* **382** : 213-237
- Standen NB, Quayle JM, Davies NW, Brayden JE, Huang Y, Nelson MT (1989). "Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in arterial smooth muscle". *Science* **245** :177-180

- Stoffel M, Espinosa R 3rd, Powell KL, Philipson LH, Le Beau MM, Bell GI (1994). "Human G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channel (GIRK1) gene (KCNJ3) : localization to chromosome 2 and identification of a simple tandem repeat polymorphism". *Genomics* **21** : 254-256
- Sturgess NC, Ashford ML, Cook DL, Hales CN (1985). "The sulphonylurea receptor may be an ATP-sensitive potassium channel". *Lancet* **2** : 474-475
- Szczyepka MS, Wemmie JA, Moye-Rowley WS, Thiele DJ (1994). " A yeast metal resistance protein similar to human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and multidrug resistance-associated protein *J. Biol. Chem.* **269** : 22853-22857
- Szewczyk A (1997). "Intracellular targets for antidiabetic sulfonylureas and potassium channel openers". *Biochem. Pharmacol* **54** : 961-965
- Szewezyk A, Wojcik G, Lobanov NA, Nalecz MJ (1997). "The mitochondrial sulfonylurea receptor : identification and characterization". *Biochem Biophys. Res. Commun.* **230** : 611-615

## T

- Tanabe K, Tucker SJ, Ashcroft FM, Proks P, Kioka N, Amachi T, Ueda K (2000). "Direct photoaffinity labeling of Kir6.2 by [ $\gamma$ -(32)P]ATP- $\gamma$ -azidoanilide". *Biochem Biophys Res Commun.* **272** : 316-319
- Tanabe K, Tucker SJ, Matsuo M, Proks P, Ashcroft FM, Seino S, Amachi T, Ueda K (1999). "Direct photoaffinity labeling of the Kir6.2 subunit of the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel by 8-azido-ATP". *J Biol Chem.* **274** : 3931-3933
- Terzic A, Jahangir A, Kurachi Y (1995). "Cardiac ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels : regulation by intracellular nucleotides and K<sup>+</sup> channel opening drugs". *Am. J. Physiol.* **269** : C525-545
- Terzic A, Tung RT, Inanobe A, Katada T, Kurachi Y (1994). "G proteins activate ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels by antagonizing ATP-dependent gating". *Neuron* **12** : 885-893
- Terzic A, Vivaudou M (2001). "Molecular Pharmacology of ATP-sensitive K<sup>+</sup> Channels : How and Why?". Potassium Channels in Cardiovascular Biology ,ed. Archer and Rusch, Academic/Plenum Publishers, NY. Chap 15 : 257-277
- Thomas PJ, Hunt JF (2001). "A snapshot of Nature's favorite pump". *Nat Struct Biol.* **8** : 920-92
- Thuringer D, Escande D (1989). "Apparent competition between ATP and the potassium channel opener RP 49356 on ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels of cardiac myocytes". *Mol. Pharmacol.* **36** : 897-902.
- Trübe G, Hescheler J (1984) "Inward-rectifying channels in isolated patches of the heart cell membrane : ATP-dependence and comparison with cell-attached patches. *Pflügers Arch.* **401** : 178-184
- Trube G, Rorsman P, Ohno-Shosaku T (1986). "Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on the ATP-dependent K<sup>+</sup> channel in mouse pancreatic  $\beta$ -cells". *Pflügers Arch.* **407** : 493-499
- Tucker SJ, Gribble FM, Proks P, Trapp S, Ryder TJ, Haug T, Reimann F, Ashcroft FM (1998) . "Molecular determinants of K<sub>ATP</sub> channel inhibition by ATP". *EMBO J.* **17** : 3290-3296

Tucker SJ, Gribble FM, Zhao C, Trapp S, Ashcroft (1997). "Truncation of Kir6.2 produces ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the absence of the sulfonylurea receptor". *Nature* **387** : 179-183

Tucker SJ, James MR, Adelman JP (1995). "Assignment of KATP-1, the cardiac ATP-sensitive potassium channel gene (KCNJ5), to human chromosome 11q24". *Genomics* **28** : 127-128

Tusnadi GE, Bakos E, Varadi A, Sarkadi B (1997). "Membrane topology distinguishes a subfamily of the ATP-binding cassette (ABC) transporters". *FEBS Lett.* **402** : 1-3

## U

Ueda K, Inagaki N, Seino S (1997). "Mg-ADP antagonism to Mg<sup>2+</sup>-independent ATP binding of the sulfonylurea receptor SUR1". *J. Biol. Chem.* **272** : 22983-22986

Uhde I, Toman A, Gross I, Schwanstecher C, Schwanstecher M (1999). "Identification of the Potassium Channel Opener Site on Sulfonylurea Receptors". *J. Biol. Chem.* **274** : 28079-28082

## V

van Veen HW, Margolles A, Muller M, Higgins CF, Konings WN (2000). "The homodimeric ATP-binding cassette transporter LmrA mediates multidrug transport by an alternating two-site (two-cylinder engine) mechanism". *EMBO J.* **19** : 2503-2514

Vandenberg CA (1987). "Inward rectification of a potassium channel in cardiac ventricular cells depends on internal magnesium ions". *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **84** : 2560-2564

Virsolvy-Vergine A, Leray H, Kuroki S, Lupo B, Dufour M, Bataille D (1992). "Endosulfine, an endogenous peptidic ligand for the sulfonylurea receptor : Purification and partial characterization from ovine brain". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89** : 6629-6633

Vivaudou M, Forestier C (1995). "Modification by protons of frog skeletal muscle K<sub>ATP</sub> channels : effects on ion conduction and nucleotide inhibition". *J. Physiol. (London)* **486** : 629-645

Vivaudou MB, Arnoult C, Villaz M (1991). "Skeletal muscle ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels recorded from sarcolemmal blebs of split fibers : ATP inhibition is reduced by magnesium and ADP". *J. Membr Biol.* **122** : 165-175

## W

Wada Y, Yamashita T, Imai K, Miura R, Takao K, Nishi M, Takeshima H, Asano T, Morishita R, Nishizawa K, Kokubun S, Nukada T (2000). "A region of the sulfonylurea receptor critical for a modulation of ATP-sensitive K(+) channels by G-protein betagamma-subunits". *EMBO J.* **19** : 4915-4925

Warrens A.N., Jones M.D. et Lechler R.I. (1997). "Splicing by overlap extension by PCR using asymmetric amplification : an improved technique for the generation of hybrid proteins of immunological interest". *Gene* **186** : 29-35

Weiss JN, Venkatesh (1993). "Metabolic regulation of cardiac ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels". *Cardiovasc. Drug Ther.* **7** : 499-505

Wijnholds J, Mol CA, van Deemter L, de Haas M, Scheffer GL, Baas F, Beijnen JH, Scheper RJ, Hatse S, De Clercq E, Balzarini J, Borst P (2000). "Multidrug-

resistance protein 5 is a multispecific organic anion transporter able to transport nucleotide analogs". *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **97** :7476-7481

## Y

Yamada M, Isomoto S, Matsumoto S, Kondo C, Shindo T, Horio Y, Kurachi Y (1997). "Sulphonylurea receptor 2B and Kir6.1 form a sulphonylurea-sensitive but ATP-insensitive K<sup>+</sup> channel". *J Physiol.* **499** : 715-720

Yang J, Jan YN, Jan LY (1995). "Determination of the subunit stoichiometry of an inward rectifying potassium channel". *Neuron* **15** : 1441-1447

Yano H, Philipson LH, Kugler JL, Tokuyama Y, Davis EM, Le Beau MM, Nelson DJ, Bell GI, Takeda J (1994). "Alternative splicing of human inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel ROMK1 mRNA". *Mol Pharmacol.* **45** :854-60

Yuan YR, Blecker S, Martsinkevich O, Millen L, Thomas PJ, Hunt JF (2001). "The crystal structure of the MJ0796 ATP-binding cassette. Implications for the structural consequences of ATP hydrolysis in the active site of an ABC transporter". *J Biol Chem.* **276** : 32313-32321

## Z

Zerangue N, Schwappach B, Jan YN, Jan LY (1999). "A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels". *Neuron* **22** : 537-548

Zhou Y, Morais-Cabral JH, Kaufman A, MacKinnon R (2001). " Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K<sup>+</sup> channel-Fab complex at 2.0 Å resolution". *Nature* **414** : 43-48

Zingman LV, Alekseev AE, Bienengraeber M, Hodgson D, Karger AB, Dzeja PP, Terzic A (2001). "Signaling in channel/enzyme multimers : ATPase transitions in SUR module gate ATP-sensitive K<sup>+</sup> conductance". *Neuron.* **31** : 233-245

Zunkler BJ, Lenzen S, Manner K, Panten U, Trube G (1988). "Concentration-dependent effects of tolbutamide, meglitinide, glipizide, glibenclamide and diazoxide on ATP-regulated K<sup>+</sup> currents in pancreatic B-cells". *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* **337** : 225-230

# **ANNEXES**

# ANNEXES

## Sommaire des Annexes :

### **ANNEXE 1**

PROTCOLE DE PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR LA PCR \_\_\_\_\_ 177

### **ANNEXE 2**

PURIFICATION D'ADN SUR GEL AVEC BILLES \_\_\_\_\_ 178

### **ANNEXE 3**

TRANSFORMATION BACTERIENNE \_\_\_\_\_ 179

### **ANNEXE 4**

PROTCOLE DE MINIPREP \_\_\_\_\_ 180

### **ANNEXE 5**

PROTCOLE DE MIDIPREP \_\_\_\_\_ 181

### **ANNEXE 6**

TRANSCRIPTION *in vitro* \_\_\_\_\_ 182

### **ANNEXE 7**

OPERATION DES XENOPES \_\_\_\_\_ 185

### **ANNEXE 8**

MICRO-INJECTION D'ARNm DANS LES OVOCYTES DE XENOPES \_\_\_\_\_ 188

### **ANNEXE 9**

SOLUTIONS STOCKS \_\_\_\_\_ 191

### **ANNEXE 10**

PREPARATION DES SOLUTIONS POUR LE PATCH CLAMP \_\_\_\_\_ 192

### **ANNEXE 11**

PROCEDURE DE "PATCHAGE" \_\_\_\_\_ 193

### **ANNEXE 12**

ECHANTILLONAGE ET ANALYSE DES RESULTATS \_\_\_\_\_ 198

### **ANNEXE 13**

ALIGNEMENT DE SEQUENCE SUR1/SUR2A \_\_\_\_\_ 201

## ANNEXE 1.

## PROTOCOLE DE PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR LA PCR

	SUR1	SUR2A
10X Buffer	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
DNA Matrix Conc° mère:	1 $\mu$ l 12 ng/ $\mu$ l	1 $\mu$ l 12 ng/ $\mu$ l
F Oligo	1.3 $\mu$ l	1.3 $\mu$ l
R Oligo	1.3 $\mu$ l	1.3 $\mu$ l
dNTP	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
H2O autoclavée	40 $\mu$ l	40 $\mu$ l
Enzyme Pfu	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l

## ANNEXE 2.

### PURIFICATION D'ADN SUR GEL AVEC BILLES (QIAGEN)

1. Découper le fragment sur le gel en limitant l'exposition aux UV  
poids = eppendorf avec gel - eppendorf vide
2. + 3 volume QX1 + 2 volume H<sub>2</sub>O si bandes > 4kb ; + 30 µl billes ( pour ≅ 10 µg ADN)
3. Chauffer à 50°C pendant 10 min en vortexant toutes les 2 min
4. Le contenu doit être jaune sinon rajouter de l'acétate de sodium
5. Centrifuger 30 sec, éliminer surnageant
6. + 500 µl Qx1, vortexer, centrifuger 30 sec, éliminer le surnageant
7. + 500 µl PE, vortexer, centrifuger 30 sec, éliminer le surnageant (bis)
8. Laisser évaporer 10 à 15 min à T°C ambiante
9. + 20 µl d'H<sub>2</sub>O, chauffer 5 min à 50°C
10. centrifuger 30 sec
11. Laisser refroidir pour éviter l'évaporation
12. Récupérer le surnageant
13. Rechauffer à 50°C pour récupérer plus de surnageant

Auteur: Hélène Jacquet

## ANNEXE 3.

## TRANSFORMATION BACTERIENNE

(QuickChange Mutagenesis Kit)

1. Mettre les tubes Falcon ref. 2059 dans la glace
2. Transvaser la réaction PCR traité par DpnI (ou les produits d'une ligation) dans nouveau tube ( $\approx 25\mu\text{l}$  en évitant l'huile, bulle d'air dans la pipette pour chasser l'huile)
3. Mettre  $50\mu\text{l}$  de cellules compétentes dans chaque tube falcon
4. Mélanger 1 à  $2\mu\text{l}$  d'ADNc (suivant l'intensité sur gel) avec les  $50\mu\text{l}$  cellules compétentes
5. Mélanger, puis laisser 30 min sur la glace
6. Préparer milieu LB enrichi
 

Pour 10 ml de milieu :	50 $\mu\text{l}$	MgCl <sub>2</sub>	1M
	50 $\mu\text{l}$	Mg SO <sub>4</sub>	1M
	8 $\mu\text{l}$	KCl	3M
	200 $\mu\text{l}$	glucose	0.5M

Préchauffer à  $42^\circ\text{C}$ ,  $\approx 20$  min
7. Effectuer le choc thermique à  $42^\circ\text{C}$  pendant 45 sec
8. Puis laisser 2 min à  $4^\circ\text{C}$
9. Ajouter 0.5 ml de LB enrichi, avec un filtre (seringue 2 ml)
10. Puis incuber 1h à  $37^\circ\text{C}$  sous agitation moyenne (150rpm)
11. Etaler  $250\mu\text{l}$  sur une boîte de Pétri contenant du milieu LB + Ampicilline
12. Incuber à  $37^\circ\text{C}$   $\geq 16\text{h}$
13. Sélectionner plusieurs colonies pour l'extraction d'ADN plasmidique par MiniPrep

Auteur : Hélène Jacquet

## ANNEXE 4.

### PROTOCOLE DE MINIPREP

(Qiagen)

(d'après Patrice Catty)

1. Lancer la culture bactérienne la veille au soir (soit 2 ml de milieu LB + ampicilline dans tube Eppendorf)
2. Centrifuger 10 min (centrifugeuse de paillasse)
3. Eliminer le surnageant.
4. Ajouter 300µl de solution P1-RNase, vortexer
5. Ajouter 300µl de solution P2, Mélanger doucement
6. Ajouter 300µl de solution P3, laisser 10 min sur la glace
7. Centrifuger 15 min, puis récupérer env. 850 µl de surnageant
8. Recentrifuger si nécessaire pour éliminer les débris bactériens
9. Ajouter 0.7 volume (595µl) d'isopropanol
10. Centrifuger 10 min
11. Laver les culots d'ADN avec 1 ml d'éthanol 70%
12. Sécher et récupérer l'ADN dans 20 µl d'eau stérile

Auteur : Hélène Jacquet

## ANNEXE 5.

## PROTOCOLE DE MIDIPREP

(Qiagen)

**A.**

Lancer la culture la veille au soir dans 50ml de LB+Ampicilline

**B.**

Mettre le tampons P3 du kit Qiagen, dans glace

1. Transvaser la culture dans un Falcon 20' dans la centrifugeuse Jouan CR312, 3600tr/min
2. Vider le surnageant de culture et resuspendre le culot bactérien dans 3.5ml de tampon P1 (bien rajouter de la RNase), Aller et retour + Vortex
3. Rajouter 3.5ml P2, mélanger doucement et laisser à T°C ambiante, maxi 5' .Préparer les filtres QUIfiltermidi. Mettre embouts bleus
4. Rajouter 3.5ml P3 (refroidi dans la glace), Mixer doucement immédiatement (précipité des débris membranaires) Puis verser sur les filtres
- 3.bis *En absence de filtres, centrifuger 20' dans la centrifugeuse Jouan, récupérer surnageant, transvaser dans tube Sorvall RC-5C, centrifugeuse 18000 tr/min – 20', puis passer sur colonnes équilibrées*
5. 10', T°C ambiante (les débris remontent)
6. Laver les tubes Falcon (eau-alcool-eau), et préparer les colonnes sur les supports au dessus des tubes Falcon
7. Equilibrer ces colonnes avec 4ml de tampon QBT
8. A l'aide d'une seringue, Passer le filtre sur la colonne (liaison de l'ADN), Aller doucement et faire attention à ne pas laisser passer de débris qui bouchent la colonne
9. Laver avec deux fois 10ml de tampon QC (temps ~20'), attention l'extrémité de la colonne doit rester propre)
10. Prendre des tubes pour la centrifugeuse Sorvall « Sorvall instrument »
11. Placer les colonnes sur ces tubes à centrifugation
12. +5ml de tampon d'élution QF
13. +3.5ml d'isopropanol
14. Centrifugation 30' minimum, 19000 (rotor SS34, code 5)
15. Eliminer surnageant, Reprendre culot (peu visible !, en forme d'anneau) avec 2ml d'éthanol 70%
16. Centri 30' minimum, 19000
17. Eliminer le surnageant (Attention le culot peu visible ne tient pas forcément bien aux parois)
18. Laisser sécher à l'air ( > 15min)
19. Reprendre dans 100µl H<sub>2</sub>O stérile ( le TE inhiberait les enzymes)
20. Faire les digestions contrôles et conserver à -20°C

Auteur: Hélène Jacquet

## ANNEXE 6.

### TRANSCRIPTION *in vitro*

(Kit AMBION et Réactifs Gibco BRL)

#### DNA purification before transcription

Principle: Phenol:Chloroform extraction to remove proteins (in particular RNase) and RNA. Avoid any addition of RNase.

1. DNA linearized overnight at 37C with appropriate endonuclease
2. Use only RNase-free solutions, tips, tubes.
3. Dilute samples with DEPC-H<sub>2</sub>O to get a volume of about 500 µl
4. Add equal volume of RNA TE-saturated Phenol/Sevaq solution.
5. Vortex 10". Spin 2'
6. Prepare fresh tubes filled with estimated volume of RNA TE-saturated Phenol/Sevaq solution
7. Transfer upper aqueous phase with pipetman to these tubes
8. Vortex 10". Spin 2'
9. Prepare fresh tubes filled with estimated volume of RNA Sevaq solution
10. Transfer upper aqueous phase with pipetman to these tubes
11. Vortex 10". Spin 2'
12. Transfer upper aqueous phase with pipetman to fresh tubes.
13. For each sample, estimate sample volume V. Add V/10 of 3M RNA NaAcetate (pH 5.2) and 2.5xV of RNA 100% Ethanol. Leave on dry ice 15 min (-20°C)
14. Spin 10'-30'. Discard supernatant thoroughly. Tap on towel.
15. Wash pellet: Add 1ml RNA 70% Ethanol. Vortex briefly to detach pellet.
16. Spin 4' max speed. Pour out supernatant
17. Quick spin max speed
18. Pipet out remaining 70% ethanol
19. Allow pellet to dry in air 10 min or Speedvac 10' medium dry
20. Resuspend pellet in DEPC-H<sub>2</sub>O buffer to get a concentration of more than 200 ng/µl. Vortex briefly. Fast spin. Put in 37C water bath for 10'. Fast spin
21. Check on agarose gel using 1 µl.

#### In-Vitro Transcription

Linearize DNA

22. Purify linearized DNA
23. Use only RNase-free solutions, tips, tubes.
24. Add at room temperature:
25. DEPC-H<sub>2</sub>O for a final volume of 20  $\mu$ l
26. 2 $\mu$ l 10X transcription buffer
27. 10 $\mu$ l rNTP mix
28. 1 $\mu$ g linearized templated (max 5 $\mu$ l)
29. 2 $\mu$ l enzyme mix
30. 1 $\mu$ l RNasin (RNase inhibitor)
31. Mix with finger. Incubate at 37C for 4h.
32. Add 15 $\mu$ l 10X NH<sub>4</sub>Acetate and 115 $\mu$ l DEPC-H<sub>2</sub>O
33. Add 100  $\mu$ l of RNA H<sub>2</sub>O-saturated Phenol and 100  $\mu$ l of Sevaq solution
34. Vortex 10". Spin 2'
35. Transfer upper aqueous phase with pipetman to fresh tubes (100  $\mu$ l)
36. Reextract organic phase: Add 50  $\mu$ l DEPC-H<sub>2</sub>O.
37. Vortex 10". Spin 2'
38. Pool upper aqueous phase with pipetman with previous tubes (60  $\mu$ l)
39. For each sample, estimate sample volume and add equal volume of RNA Isopropanol. (180  $\mu$ l)" Leave on dry ice 30' (-20°C O.N.)
40. Spin 30' at 4C. Pour out supernatant. Dry on towel.
41. Wash pellet: Add 0.5 ml RNA 70% Ethanol. Mix gently by inversion.
42. Spin 5' max speed at 4C. Pour out supernatant
43. Quick spin max speed
44. Pipet out remaining 70% ethanol
45. Speedvac 10' medium dry
46. Resuspend pellet in DEPC-H<sub>2</sub>O to get a concentration of more than 500 ng/ $\mu$ l. (generally 20  $\mu$ l)" Fast spin" Put in 37C water bath for 5'-10'. Fast spin
47. Estimate concentration on agarose gel using 1  $\mu$ l

### Preparing gel

For 50 ml 1% gel

48. Set waterbath at 60°C under hood
49. Mix and put in waterbath:
  - 8 ml formaldehyde
  - 2 ml 0.5M Phosphate buffer
  - 15 ml autoclaved H<sub>2</sub>O

50. Mix and heat with microwave:
  - 25 ml autoclaved H<sub>2</sub>O
  - 0.5 g Agarose
51. Mix everything and put in waterbath for a few minutes
52. Pour in dH<sub>2</sub>O-rinsed gel apparatus
53. Running buffer:
  - 360ml autoclaved H<sub>2</sub>O
  - 32 ml formaldehyde
  - 8 ml 0.5M phosphate buffer

Auteur : Michel Vivaudou

## ANNEXE 7.

## OPERATION DES XENOPES

(d'après Michèle Ildefonse)

**SOLUTIONS :**Solution A

	(×1)	Pour 1 litre (×25)
NaCl	88mM	128g
KCl	1mM	1,864g
NaHCO <sub>3</sub>	2.4mM	5,041g = 1 aliquote de 20 ml
	grand congélo	
Hepes	16mM	89,36g
MgSO <sub>4</sub>	0.82mM	5,053g
Ajuster pH 7.4		

Solution B

CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.41mM	2,61g	= 1 aliquote de 20ml
-------------------------------------	--------	-------	----------------------

NB : Pour les solutions A+B et A seul mettre un aliquote de chaque solution dans 500 ml eau distillée.

Solution de Collagénase :

collagénase	2mg/ml	40mg
solution A		20ml

Solution A+B+Antibiotiques (Pénicilline, streptomycine, gentamicine)

Pénicilline	10000 U/ml	1 aliquote
streptomycine	10000µg/ml	
gentamycine	0.1 mg/ml	10mg
solution A+B		qsp 100ml

Conservation 8 jours maximum à +4°C

Solution anesthésiante :

3-aminobenzoï c acid éthyl ester	≈ 1g/l	1g
eau		≈ 1litre

**MATERIELS NECESSAIRES**

- 1 grand bēcher plastique de 5 litres.
- pinces, ciseaux fins, scalpel.
- aiguille VICRYL avec fil résorbable.

- bac avec glace.
- Boite de Pétri pour mettre les œufs.
- Gants
- Solution A+B
- Seringue avec filtre 0,22µm contenant la solution A+B

### MODE OPERATOIRE :

#### OPERATION:

1. Préparer préalablement toutes les solutions sauf la solution anesthésiante.
2. Juste avant l'opération, mettre 1g d'anesthésiant dans 1 litre d'eau dans un grand bûcher de 5 litre.
3. Placer la grenouille dans cette solution pendant  $\approx$  20 min.
4. Déposer la *Xénope* dos sur la glace.
5. Découper latéralement la première peau glissante sur 1,5 cm maximum.
6. Toujours avec les ciseaux, découper la peau blanche, puis le muscle.
7. Extraire les lobes d'ovocytes avec la petite pince et les mettre dans une boîte de Pétri contenant la solution A+B.
8. Rincer la plaie avec la seringue contenant la solution A+B et repousser les œufs vers l'intérieur.
9. Recoudre en premier la peau blanche et le muscle ensemble avec des points de suture en croix.
10. Puis recoudre la peau glissante indépendamment avec des points de suture en U.
11. Nettoyer le dos de la *Xénope* avec l'eau courante et la mettre dans un grand bûcher de 5 litres contenant un peu d'eau, le nez surélevé sur une pierre, pour un réveil en douceur de 3-4 heures. Ne pas oublier le couvercle.
12. La remettre avec les autres.

#### TRAITEMENT A LA COLLAGENASE :

1. Mettre les œufs dans une petite boîte de Pétri contenant la solution A+collagénase.
2. Avec les pinces, déchiqueter les lobes pour que les ovocytes soient en contact avec la collagénase.
3. Incuber 40 min à 19°C puis changer la solution de collagénase.
4. Réincuber 40 min à 19°C et changer de nouveau la collagénase pour une dernière incubation de 40 min à 19°C (soit un total de 3\*40 min dans la collagénase avec 2 changements de solutions).

5. Vérifier le niveau de digestion du tissu conjonctif, si il est insuffisant, incubé encore 15 minutes dans la collagénase puis revérifier.
6. Rincer 10 fois les œufs avec la solution A à l'aide de tubes coniques Falcon de 15 ml.
7. Au dernier rinçage, resuspendre les œufs dans la solution A+B+Antibiotiques.
8. Verser les œufs dans une boîte de Pétri plus grande et trier les œufs en éliminant les mauvais (mauvaise pigmentation, prêt à éclater, trop petit...)
9. Incuber les ovocytes dans la solution A+B+antibiotique à 19°C toute la nuit et les retrier le lendemain.
10. Ils sont prêts pour la microinjection d'ARNm.

## ANNEXE 8.

## MICRO-INJECTION D'ARNm DANS LES OVOCYTES DE XENOPES

**PREPARATION DES SOLUTIONS D'ARNm ET DES OVOCYTES:**

1. Mettre des gants et prendre le petit bac vert rempli de glace pour aller chercher les solutions d'ARNm au congélateur à -80°C.
2. Réaliser le mélange des transcrits d'ARNm de la façon suivante (garder les gants):  
*Remarque:* mettre les eppendorfs contenant l'eau DEPC au froid avant de réaliser les mélanges d'ARNm.

**Exemple**

<b>kir 6.2</b> (30/01/02) [0.15 µg/µl]	2ng /50nl	0.12µg /3µl	<b>+ 1µl</b>
<b>sur 1</b> (29/01/02) [0.36 µg/µl]	0.6ng /50nl	0.36µg /3µl	<b>+ 1µl</b>  <b>+ 1µl d'eau DEPC</b>
<b>kir 6.2</b> (30/01/02) [0.12 µg/µl]	2ng /50nl	0.12µg /3µl	<b>+ 1µl</b>
<b>sur 2A</b> (28/01/02) [0.36 µg/µl]	6ng /50nl	0.36µg /3µl	<b>+ 1µl</b>  <b>+ 1µl d'eau DEPC</b>

3. Bien mélanger les solutions en tapotant les eppendorfs avec les doigts et les culotter avec une petite centrifugation, de même pour les solutions mères de transcrits.
4. Mettre les mélanges en attendant dans la glace ou à -20°C et ranger à -80°C les solutions mères d'ARNm.
5. Remplir une microplaque de titration de solution A+B+Atb dans tous les puits.

**ETIRER LES PIPETTES :**

6. Programme : RESET      18    ENTR (1. Heat=315, Pull=, Vel=10, Time=80)  
(2. Heat=285, Pull=94, Vel=16, Time=60)
7. Mettre les tubes capillaires en verre dans la rainure et serrer la première vis.

8. Rapprocher les deux taquets et faire glisser le tube en faisant attention au filament.
9. Serrer les deux vis et appuyer sur la touche verte 'Pull'.
10. Récupérer délicatement les pipettes dans une boîte contenant de la pâte à modeler.

### **USINAGE DES PIPETTES :**

11. Placer la pipette dans la tige support de l'appareil, elle même replacée dans son logement.
12. Au faible grossissement, rapprocher le plus possible l'extrémité de la pipette du filament.
13. Se mettre au fort grossissement et placer la pipette de telle façon que le diamètre intérieur soit égal à 4-5 divisions.
14. Casser la pipette en l'avancant ou en la reculant vers le filament tout en gardant la mise au point sur la pipette.

### **MICRO-INJECTION (utiliser des gants et des cônes "ARN"):**

15. Descendre le piston au maximum (touche empty) et le remonter un peu (touche fill).
16. Toujours avec des gants, mettre de l'huile minérale dans toute la pipette en utilisant la seringue *Hamilton*.
17. Mettre la pipette autour du piston et serrer modérément la vis-joint.
18. Si besoin chasser l'air à l'extrémité de la pipette en appuyant sur la touche empty.
19. Préparer la mise au point de la loupe binoculaire pour le prélèvement de la solution d'ARNm.
20. Déposer une goutte d'ARNm ( $\approx 1.5\mu\text{l}$  pour 24 œufs) dans une cupule de pesage en plastique blanc.
21. Prélever rapidement la solution (l'évaporation est rapide) en appuyant sur fill tout en observant à la loupe binoculaire (fort grossissement) que la pipette ne se bouche pas, sinon vider un peu et reprélever l'ARNm.
22. Vérifier le code correspondant au volume pour obtenir une injection de 50 nl (Down-Up-Down-Up).
23. Tester le micro-injecteur en appuyant sur la pédale de commande d'injection.
24. Mettre la quantité d'œufs désirée dans la boîte de Pétri grillagée et les regrouper au centre en faisant tourner la boîte.
25. Descendre la pipette sur un ovocyte et transpercer sa membrane d'un geste sec.

26. Injecter l'ARNm en appuyant sur la pédale, attendre un peu que l'ovocyte ait fini de gonfler.
27. Déposer chaque ovocyte injecté dans un puits de la plaque de microtitration.
28. Recommencer pour une autre construction en changeant de pipette.
29. Reprendre à partir de la ligne 16.

**MATERIELS:**

- Micropipette *Finnpipette 0.5-10 µl*
- Centrifugeuse de paillasse pour eppendorf *Qualitron DW-41*
- Etireuse de pipette *Sutter instrument Co. P-97*
- Tube capillaire en verre pour pipette de micro-injection *Drummond scientific company 3½ "Drummond" #300-203-G/X.*
- Appareil à usiner les *pipettes Narishige scientific instrument lab. Japon MF-83.*
- Appareil de micro-injection *Drummond Nanoject #3-00-203-X.*
- Loupe binoculaire *Leica Wild M3Z.*

## ANNEXE 9.

### SOLUTIONS STOCKS

#### ATP-K<sub>2</sub> stock

ATP-K <sub>2</sub>	125 mM
Pipes	62,5 mM

Ajuster pH à 7,1 avec une solution de KOH

Préparer la solution dans la glace pour limiter l'hydrolyse de l'ATP

#### KCl pipette

K <sub>2</sub> -Pipes	10 mM
KCl	136 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM

Ajuster pH à 7,1 avec une solution de KOH

#### KMS 40Cl 0ATP 1Mg

(solution de base pour les solutions de perfusion)

K <sub>2</sub> Pipes	10 mM
K <sub>4</sub> EGTA	1 mM
KCl	38 mM
KMS	88 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM

Ajuster PH à 7,1 avec une solution de KOH

#### KMS 40Cl 1ATP 1Mg

(solution dans laquelle baigne l'ovocyte lors de la manipulation de patch)

ATP-K <sub>2</sub> (125 mM)	0,4 ml
KMS 40Cl 0ATP 1Mg	qsp 50ml

## ANNEXE 10.

## PREPARATION DES SOLUTIONS POUR LE PATCH CLAMP

Total Vol = 10ml															
Stock Name	ATP	ADP	SR	Diazoxide	P1075	HOE234		0ATP 1Mg	ATP	ADP	SR	Diazoxide	P1075	HOE234	
Stock Conc	100mM	100mM	20mM	100mM	20mM	10mM			100mM	100mM	20mM	100mM	20mM	10mM	
1							1	10ml							
2	100uM						2	9.89ml	10ul					100ul	
3	100uM						3	9.98ml	10ul					10ul	
4	100uM				100uM		4	9.94ml	10ul				50ul		
5	100uM				10uM		5	9.99ml	10ul				5ul		
6	100uM		100uM				6	9.94ml	10ul		50ul				
7	100uM		10uM				7	9.99ml	10ul		5ul				
8	100uM						8	9.99ml	10ul						
<b>focus</b>							<b>focus</b>								
10							10	10ml	0l						
11	1mM						11	9.9ml	100ul						
12	100uM			300uM			12	9.96ml	10ul			30ul			
13	100uM	100uM					13	9.98ml	10ul	10ul					
14	100uM	100uM		300uM			14	9.95ml	10ul	10ul		30ul			
15	300uM						15	9.97ml	30ul						
16	30uM						16	10ml	3ul						
17	10uM						17	10ml	1ul						
18							18	10ml							
<b>Total=</b>								169ml	234ul	20ul	55ul	60ul	55ul	110ul	

## ANNEXE 11.

### PROCEDURE DE "PATCHAGE"

#### PREPARATION DES SOLUTIONS

- 1) Commencer par dégazer la solution de 0ATP 1Mg ou 0ATP 5EDTA selon le protocole
- 2) Numéroté les tubes
- 3) Utiliser les tableaux du fichier Excel SOLUTIONS. (), pour préparer les solutions

#### PREPARATION DES PIPETTES

- 1) Allumer l'étireuse
- 2) Taper 25 ENTER
- 3) Placer un tube capillaire (KIMAX-51, size 0.8-1.10\*100mm) dans la rainure et serrer presque à fond le premier taquet
- 4) faire coulisser le capillaire en faisant attention au filament, puis serrer à fond les deux taquets
- 5) appuyer sur "PULL" et laisser faire
- 6) Récupérer délicatement les micropipettes dans une boîte avec de la pâte à modeler
- 7) Remettre un tube capillaire et recommencer les étapes 4) à 8)
- 8) Quand toutes les micropipettes sont étirées, éteindre l'étireuse

#### PREPARATION DU POSTE DE PATCH CLAMP

- 1) Allumer les deux multiprises et le micromanipulateur
- 2) Sur le RSC100, lever le levier "select tube" et appuyer sur "reset" et relâcher le bouton "reset", puis le levier "select tube" dès que "4 steps/tube" apparaît.
- 3) Sur le DAT, rembobiner la cassette jusqu'au début, appuyer sur "reset" puis "0" et "start". L'appareil recherchera alors automatiquement la fin du dernier enregistrement
- 4) Lancer le programme "Perf" sur l'ordinateur et vérifier que le RSC100 et à la même vitesse que le logiciel, sinon cliquer avec la souris sur la barre de défilement de la fenêtre "adjust speed" du logiciel
- 5) Cliquer sur "Edit" et rentrer le nom des solutions au niveau des numéros de tubes correspondants
- 6) Mettre les solutions dans les réservoirs et expulser grossièrement les bulles avec le piston
- 7) Placer une boîte de Pétri avec de l'eau sur le microscope et y plonger la tête de perfusion

- 8) Faire tourner la tête de perfusion (fenêtre "Perfusion control") de façon à faire apparaître le tube focus (avec l'aiguille) au centre de l'écran
- 9) Cliquer sur "up" ou "down" de la fenêtre "Perfusion control" jusqu'à ce que le tube 9 de la fenêtre soit sélectionné
- 10) Réduire la luminosité du microscope et du moniteur si besoin pour observer le flux à la sortie des tubes de la tête de perfusion
- 11) Monter le portoir des réservoirs
- 12) Vérifier que le liquide coule pour chaque tube, sinon expulser les bulles avec le piston
- 13) Descendre le portoir pour économiser les solutions et placer la tête de perfusion au dessus du bûcher-poubelle

### PELAGE DES OVOCYTES

- 1) Choisir un bel ovocyte (phase clair un peu sombre avec un anneau clair à l'interface des pôles) dans la plaque de microtitration
- 2) Le mettre quelques minutes dans la solution hypertonique "Shrinking":

NaCl 5M	1ml
Solution A	qsp 50ml
- 3) Se mettre sous la loupe binoculaire au fort grossissement
- 4) Prendre les deux pinces extrêmement affûtées et essayer d'enlever la membrane vitelline
- 5) Vérifier que la membrane vitelline a disparu en utilisant une lumière rasante
- 6) A partir de ce moment, l'ovocyte est très fragile surtout à une exposition à l'air
- 7) Mettre l'ovocyte dans une boîte de Pétri contenant une solution 1ATP 1Mg
- 8) Insérer la boîte de Pétri dans la plaque mobile du microscope
- 9) Mettre la terre

### LE "PATCHAGE"

- 1) Remplir au 1/3 la pipette avec la "seringue au filtre bleu" contenant du KCl pipette
- 2) Tenir l'extrémité de la pipette dans une main tout en se servant de l'autre pour donner des pichenettes (comme aux billes) dans le bas de la pipette pour enlever les petites bulles
- 3) Maintenir la pipette à son extrémité et donner un violent coup de bras (comme un smash au volley) pour enlever les plus grosses bulles
- 4) Introduire la pipette sur le filament d'argent chloruré, et visser le joint de papier d'aluminium "anti-parasite"
- 5) Mettre la pression dans le tube d'eau colorée au bleu trypan, en soufflant pendant que le robinet est orienté vers le haut, et le fermer en l'orientant vers soi

- 6) Basculer le bloc du micromanipulateur en le maintenant fermement, et bien serrer la vis noire avant de le lâcher
- 7) Approcher la pipette de l'ovocyte à l'œil nu, puis avec le microscope au faible grossissement
- 8) Faire la mise au point sur le contour de l'ovocyte et descendre la pipette jusqu'à ce qu'elle soit également nette au niveau de son extrémité
- 9) Placer le bord de l'ovocyte et la pipette au centre de l'écran
- 10) Passer au fort grossissement et refaire la mise au point sur le contour de l'ovocyte et déplacer également la pipette en conséquence, avec le micromanipulateur si nécessaire
- 11) Mesurer la résistance électrique de la pipette en cliquant sur "Small" puis "start" dans la fenêtre "Search Mode"
- 12) Sur l'amplificateur RK300, mettre search on, vérifier que le leak est off et que nous sommes en Vclamp et que le gain est de  $2 \times 10 \text{ mV/pA}$
- 13) Sur l'oscilloscope, se placer à  $1 \text{ V/div}$  (Y pos. I) et  $5$  ou  $2 \text{ ms/div}$
- 14) Mesurer la résistance comme suit:  
Pour une division, nous avons  $1 \text{ V} = 1000 \text{ mV}$  divisé par  $20 \text{ mV/pA}$  égale  $50 \text{ pA}$   
 $R = U/I = 200 \mu\text{V} / 50 \text{ pA} = 4 \text{ M}\Omega$
- 15) Noter sur le papier d'enregistrement le **numéro d'essai**, la **date**, le **type de construction**, la **date de micro-injection**, le **n° de la cassette**, la **résistance de la pipette**  
exemple:        #1  
                  21.10.98                     $4 \text{ M}\Omega$   
                  SUR1  
                  (inj. le 09.10.98)  
                  TAPE 94
- 16) Vérifier la "junction" en se mettant sur "Iclamp" et en "search off", le courant affiché sur l'amplificateur RK300 doit être nul, sinon tourner le bouton "junction"
- 17) Noter JN (Junction Null) sur le papier
- 18) Mettre le micro-manipulateur en "adjust speed" et se rapprocher doucement de la membrane de l'ovocyte jusqu'au contact un peu appuyé
- 19) Casser la pression en tournant le robinet vers le bas, et aspirer très très doucement pour coller la membrane au verre
- 20) Augmenter progressivement le voltage pour passer de  $200 \mu\text{V}$  à  $20 \text{ mV}$  dans la fenêtre "search mode" "pulse height" du logiciel Perf.
- 21) Le seal est correct lorsqu'il atteint généralement  $2 \text{ G}\Omega$ , ce qui correspond à 1 division sur l'oscilloscope avec une échelle de  $0,2 \text{ V/div.}$  et  $20 \text{ mV}$  en pulse
- 22) Noter la résistance du seal sur le papier d'enregistrement

- 23) Mettre l'ampli RK300 en search off et le noter SO sur le papier
- 24) Placer le micromanipulateur en high speed et exciser d'un trait rapide le patch
- 25) Mettre leak on et tourner le bouton leak jusqu'à obtenir un trait continu sur l'oscilloscope  
(le leak est environ de 150-200M $\Omega$ )
- 26) Ecarter encore la pipette et se replacer au faible grossissement
- 27) Monter la pipette (sans la sortir du liquide) en faisant la mise au point sur elle et jusqu'à deviner le ménisque d'interface eau/air
- 28) Passer l'ovocyte sous la pipette (vérifier à l'œil nu qu'il passe) et retirer délicatement la pipette du champ de vision
- 29) Approcher la tête de perfusion dans ce même bain et la descendre jusqu'à avoir nettement l'aiguille du focus
- 30) Approcher la pipette au niveau du focus et vérifier qu'elle est bien au milieu du tube en faisant jouer la mise au point sur le haut et le bas du tube
- 31) Cliquer sur "stop" dans la fenêtre "search mode" et appuyer sur "50" de l'enregistreur papier et si le déroulement est trop rapide appuyer sur "divide by"
- 32) L'enregistrement papier commence
- 33) Changer de solution en cliquant sur le tube 0ATP de la fenêtre "perfusion control", si les canaux s'ouvrent, les refermer immédiatement en se plaçant dans le tube 1mATP ou 3mATP, sinon tenter de casser la vésicule avec une rapide, très rapide sortie dans l'air
- 34) Si tout va bien, enregistrer sur K7 le patch en appuyant simultanément sur "rec" et "play" de l'enregistreur cassette DAT
- 35) Noter **l'heure du début d'enregistrement**, le **gain de l'enregistreur papier** et le **gain de l'ampli** (généralement 20mV/pA)
- 36) Tester les différentes solutions préparées dans les réservoirs
- 37) En fin de patch, appuyer sur le bouton "stop" du DAT, et noter l'heure de fin d'enregistrement
- 38) Stopper l'enregistrement papier
- 39) Descendre le portoir des réservoirs, retirer la tête de perfusion dans le grand bûcher-poubelle, soulever et reculer la pipette, puis basculer le bloc micromanipulateur avant de retirer la pipette
- 40) Recommencer à partir de 1)

### EN FIN DE JOURNEE

- 1) Mettre la tête de perfusion au dessus du bûcher
- 2) Vider les réservoirs des solutions restantes
- 3) Mettre de l'eau distillée dans ceux qui ont été utilisés pendant la journée et lever le portoir

- 4) Eliminer les bulles avec le piston
- 5) Rembobiner la cassette au début
- 6) Eteindre les deux interrupteurs du patch et le micromanipulateur
- 7) Remettre la seringue contenant le KCl pipette au frigo et nettoyer les pipettes pasteurs avant de les mettre dans l'alcool
- 8) Tout est prêt pour le lendemain

## ANNEXE 12.

## ECHANTILLONAGE ET ANALYSE DES RESULTATS

1. Repérer sur le papier déroulant, la zone d'échantillonnage
2. Noter, au début de l'enregistrement papier, la date, le n° de la cassette, la construction étudiée, le n° de la pipette, et l'heure de début et de fin d'enregistrement sur cassette.

Exemple: 16.03.98      TAPE 69  
                  Chim. A      pip: # 3      de 1h18min25s à 1h26min51s

3. Détermination du gain d'échantillonnage.

L'ordinateur est configuré pour une échelle de -10 à +10 V, ce qui représente 2\*2047 points !

D'après l'enregistrement papier, on détermine l'amplitude maximale en pA

Exemple: 8 divisions papier à 12,5 pA/division = 100pA avec un gain d'ampli de 20 mV/ pA = 2 V

Les gains de l'ordinateur sont: 1, 2, 4 et 8. Dans l'exemple ci-dessus, il faut choisir un gain-ordinateur de 4 qui donnera une amplitude maximale de - 8 V qui est la plus proche possible de la valeur de saturation égale à -10 V.

#### 4. Rentrer dans le logiciel ERWIN

| ACQUIRE DATA | SYSTEM CONFIGURATION | A/D'S GAIN

5. Appuyer sur **ENTR** pour changer le gain
6. Faire **ESC** pour sortir en enregistrant

| EXPERIMENTAL CONFIGURATION

7. comment: mettre le type de construction (date de  $\mu$ injection)
8. cell number: correspond au numéro de la pipette
9. date: c'est la date de l'enregistrement de type (jj-mm-aa)
10. **ESC**

| NAME FILE USING CELL DATE & NUMBER

11. Faire **ENTR**: modifie automatiquement le nom des fichiers

[.DAI (signaux Intensité) et .DAS (signaux Solutions)]

12. Modifier Total duration: temps d'enregistrement et d'échantillonnage.

| SAMPLE DATA INTO FILES

13. Appuyer une fois sur **ENTR**

14. Mettre la cassette au début de l'enregistrement
15. Appuyer sur **ENTR** et sur la touche Play du lecteur
16. L'échantillonnage commence. Pour l'arrêter, appuyer sur une touche quelconque du clavier

## APRES L'ECHANTILLONNAGE

17. Dans ERWIN

| INSPECT DATA (current/perf mode)

18. Permet de modifier, par exemple, les données excédentaires a l'enregistrement, en utilisant les commandes décrites dans les feuilles ci-jointes.

19. Pour chercher un fichier, taper "\*" et **ENTR**, pour changer la racine en C par exemple : taper "**C:**" et **ENTR**

| VIEW SPECIFIED FILE

20. Permet de voir les signaux et de les modifier

21. **ESC**

| BASELINE CORRECTION | INPUT FILE

22. Faire **ENTR**, "\*" et **ENTR**, choisir le fichier à corriger puis faire **ENTR**

| CORRECT BASE LINE

23. Corriger manuellement, à l'aide des commandes décrites dans la feuille n° 2 ci-jointe, en incorporant de nouveaux points.

24. Appuyer sur "-" pour soustraire la nouvelle ligne de base du signal

25. **ESC** sans sauvegarder la ligne de base

| Create WMF Files | Read Data Files

26. Choisir les fichiers qui vous intéressent (.DAI et .DAS)

27. Le logiciel se place automatiquement en mode SIZE pour sélectionner la taille de la fenêtre, appuyer sur les flèches de direction pour la modifier et sur "." pour sélectionner un autre côté à modifier.

| SPLIT (si le fichier est grand)

28. Ce mode permet de séparer l'affichage des signaux en plusieurs sous-graphiques

| WMF File Output

| PRINT | PRINT PAGE

29. Sélectionner le fichier (.PER) pour afficher la légende des solutions utilisées pour le fichier (.DAS)
30. Noter sur la feuille imprimée, les remarques inscrites sur l'enregistrement papier.  

| INSPECT DATA (current/perf mode)
31. Appuyer sur ALT TAB pour enregistrer automatiquement les mesures de courant dans un fichier ".log" qui sera analysé statistiquement dans le logiciel Excel
32. Sous Excel, effectuer les calculs automatiques de courants relatifs (Macro, Michel Vivaudou)
33. Mettre en forme les graphiques sous Excel et les figures sous CorelDraw

## ANNEXE 13.

### ALIGNEMENT DE SEQUENCE SUR1/SUR2A



SUR2ARat LAEAQKSTLDYSTERLKKTNEILKGIKLLKLYAWEHIFCKSV EETRMKELSSLKTFALYTSLSIFMNAAPIAAVLATFVTHA - YASGNLKPAAEFASLSLFHILVTPFLFLLSTVVRFA 592  
SUR2AMouse LAEAQKSTLDYSTERLKKTNEILKGIKLLKLYAWEHIFCKSV EETRMKELSSLKTFALYTSLSIFMNAAPIAAVLATFVTHA - YASGNLKPAAEFASLSLFHILVTPFLFLLSTVVRFA 593  
SUR2AHuman LAEAQKSTLDYSTERLKKTNEILKGIKLLKLYAWEHIFCKSV EETRMKELSSLKTFALYTSLSIFMNAAPIAAVLATFVTHA - YASGNLKPAAEFASLSLFHILVTPFLFLLSTVVRFA 595  
SUR2BMouse LAEAQKSTLDYSTERLKKTNEILKGIKLLKLYAWEHIFCKSV EETRMKELSSLKTFALYTSLSIFMNAAPIAAVLATFVTHA - YASGNLKPAAEFASLSLFHILVTPFLFLLSTVVRFA 593  
SUR2BHuman LAEAQKSTLDYSTERLKKTNEILKGIKLLKLYAWEHIFCKSV EETRMKELSSLKTFALYTSLSIFMNAAPIAAVLATFVTHA - YASGNLKPAAEFASLSLFHILVTPFLFLLSTVVRFA 595  
Sur2AMouseD14 LAEAQKSTLDYSTERLKKTNEILKGIKLLKLYAWEHIFCKSV EETRMKELSSLKTFALYTSLSIFMNAAPIAAVLATFVTHA - YASGNLKPAAEFASLSLFHILVTPFLFLLSTVVRFA 593  
SUR1HaB L SQAQRSTLEHSNERLKQTNEMLRGMKLLKLYAWESIFCSRVEVTRRKEMTSLRAFAVYTSISIFMNTAIPAAVLIITFVGHV SFFKESDLSPSVAFASLSLFHILVTPFLFLLS SVVRST 600  
SUR1HaG L SQAQRSTLEHSNERLKQTNEMLRGMKLLKLYAWESIFCSRVEVTRRKEMTSLRAFAVYTSISIFMNTAIPAAVLIITFVGHV SFFKESDLSPSVAFASLSLFHILVTPFLFLLS SVVRST 600  
SUR1RatA L SQAQRSTLEHSNERLKQTNEMLRGIKLLKLYAWENIFCSRVEKTRRKEMTSLRAFAVYTSISIFMNTAIPAAVLIITFVGHV SFFKESDLSPSVAFASLSLFHILVTPFLFLLS SVVRST 600  
SUR1RatB L SQAQRSTLEHSNERLKQTNEMLRGIKLLKLYAWENIFCSRVEKTRRKEMTSLRAFAVYTSISIFMNTAIPAAVLIITFVGHV SFFKESDLSPSVAFASLSLFHILVTPFLFLLS SVVRST 600  
SUR1RatBD31 L SQAQRSTLEHSNERLKQTNEMLRGIKLLKLYAWENIFCSRVEKTRRKEMTSLRAFAVYTSISIFMNTAIPAAVLIITFVGHV SFFKESDLSPSVAFASLSLFHILVTPFLFLLS SVVRST 600  
SUR1HumanA L SQAQRSTLEHSNERLKQTNEMLRGIKLLKLYAWENIFRTRVETTRRKEMTSLRAFAIYTSISIFMNTAIPAAVLIITFVGHV SFFKESDLSPSVAFASLSLFHILVTPFLFLLS SVVRST 600  
SUR1HumanB L SQAQRSTLEHSNERLKQTNEMLRGIKLLKLYAWENIFRTRVETTRRKEMTSLRAFAIYTSISIFMNTAIPAAVLIITFVGHV SFFKESDLSPSVAFASLSLFHILVTPFLFLLS SVVRST 600

SUR2ARat VKAII SVQKLN EFLLSDEIGEDSWRTGEGTLPFESCKKHTGVQSKPINRKPGRYHLDNYEQ-ARRLRP--AETEDVAIKVTNGYFSWG-SGLATLSNIDIRIPTGQLTMI VGQVGC GK 707  
SUR2AMouse VKAII SVQKLN EFLLSDEIGEDSWRAGEGTL PPFESCKKHTGVQSKPINRKPGRYHLDSEYEQ-ARRLRP--AETEDI AIKVTNGYFSWG-SGLATLSNIDIRIPTGQLTMI VGQVGC GK 708  
SUR2AHuman VKAII SVQKLN EFLLSDEIGEDSWRTGESSLPFESCKKHTGVQPKTINRKPGRYHLDSEYEQSTRRLRP--AETEDI AIKVTNGYFSWG-SGLATLSNIDIRIPTGQLTMI VGQVGC GK 711  
SUR2BMouse VKAII SVQKLN EFLLSDEIGEDSWRAGEGTL PPFESCKKHTGVQSKPINRKPGRYHLDSEYEQARRLRP--AETEDI AIKVTNGYFSWG-SGLATLSNIDIRIPTGQLTMI VGQVGC GK 708  
SUR2BHuman VKAII SVQKLN EFLLSDEIGEDSWRTGESSLPFESCKKHTGVQPKTINRKPGRYHLDSEYEQSTRRLRP--AETEDI AIKVTNGYFSWG-SGLATLSNIDIRIPTGQLTMI VGQVGC GK 711  
Sur2AMouseD14 VKAII SVQKLN EFLLSDEIGEDSWRAGEGTL PPFESCKKHTGV-----VTNGYFSWG-SGLATLSNIDIRIPTGQLTMI VGQVGC GK 673  
SUR1HaB VKALVSVQKLS EFLSSAEIREEQCAPRE-PAPQGGAGKYQAVPLKVVNRKRPARAEVVDLLGLPQLRLAPSMDDADNFCVQIIGGFFWTDPDGIPTLSNITIRIPRGQLTMI VGQVGC GK 719  
SUR1HaG VKALVSVQKLS EFLSSAEIREEQCAPRE-PAPQGGAGKYQAVPLKVVNRKRPARAEVVDLLGLPQLRLAPSMDDADNFCVQIIGGFFWTDPDGIPTLSNITIRIPRGQLTMI VGQVGC GK 719  
SUR1RatA VKALVSVQKLS EFLSSAEIREEQCAPRE-PAPQGGAGKYQAVPLKVVNRKRPARAEVVDLLGLPQLRLTPSTDGADNFCVQIIGGFFWTDPDGIPTLSNITIRIPRGQLTMI VGQVGC GK 719  
SUR1RatB VKALVSVQKLS EFLSSAEIREEQCAPRE-PAPQGGAGKYQAVPLKVVNRKRPARAEVVDLLGLPQLRLTPSTDGADNFCVQIIGGFFWTDPDGIPTLSNITIRIPRGQLTMI VGQVGC GK 719  
SUR1RatBD31 VKALVSVQKLS EFLSSAEIREEQCAPRE-PAPQGGAGKYQAVPLKVVNRKRPARAEVVDLLGLPQLRLTPSTDGADNFCVQIIGGFFWTDPDGIPTLSNITIRIPRGQLTMI VGQVGC GK 719  
SUR1HumanA VKALVSVQKLS EFLSSAEIREEQCAPHE-PTPQGPASKYQAVPLRVVNRKRPARAEDCRGLTGPLQSLVPSADGADNCCVQIMGGYFTWTPDGIPTLSNITIRIPRGQLTMI VGQVGC GK 719  
SUR1HumanB VKALVSVQKLS EFLSSAEIREEQCAPHE-PTPQGPASKYQAVPLRVVNRKRPARAEDCRGLTGPLQSLVPSADGADNCCVQIMGGYFTWTPDGIPTLSNITIRIPRGQLTMI VGQVGC GK 719

SUR2ARat S SLLLA ILGEMQ TLE GK VYWN -VNESE - - - - PSFEATRS - - - - RSRYSVAYAAQKPWLLNATVEENITFGSSFNRRQRYKAVTDACSLQPDIDLLPFGDQTEIGERGINLS - GGQRRI 816  
SUR2AMouse S SLLLA ILGEMQ TLE GK VYWN -VNESE - - - - PSFEATRS - - - - RSRYSVAYAAQKPWLLNATVEENITFGSPFNRRQRYKAVTDACSLQPDIDLLPFGDQTEIGERGINLS - GGQRRI 817  
SUR2AHuman S SLLLA ILGEMQ TLE GK VYWN -VNESE - - - - PSFEATRS - - - - RSRYSVAYAAQKPWLLNATVEENITFGSPFNRRQRYKAVTDACSLQPDIDLLPFGDQTEIGERGINLS - GGQRRI 820  
SUR2BMouse S SLLLA ILGEMQ TLE GK VYWN -VNESE - - - - PSFEATRS - - - - RSRYSVAYAAQKPWLLNATVEENITFGSPFNRRQRYKAVTDACSLQPDIDLLPFGDQTEIGERGINLS - GGQRRI 817  
SUR2BHuman S SLLLA ILGEMQ TLE GK VYWN -VNESE - - - - PSFEATRS - - - - RSRYSVAYAAQKPWLLNATVEENITFGSPFNRRQRYKAVTDACSLQPDIDLLPFGDQTEIGERGINLS - GGQRRI 820  
Sur2AMouseD14 S SLLLA ILGEMQ TLE GK VYWN -VNESE - - - - PSFEATRS - - - - RSRYSVAYAAQKPWLLNATVEENITFGSPFNRRQRYKAVTDACSLQPDIDLLPFGDQTEIGERGINLS - GGQRRI 782  
SUR1HaB S SLLLAT LGEMQKVSGAVFWNSNLPDSEGEDPSNPERETAAGSDIRSRGPVAYASQKPWLLNATVEENITFESPFNKQRYKMVI EACSLQPDIDILPHGDQTQIGERGINLS - GGQRRI 838  
SUR1HaG S SLLLAT LGEMQKVSGAVFWNSNLPDSEGRGPQPPRAQDSWLG YQEQRPRG YASQKPWLLNATVEENITFESPFNKQRYKMVI EACSLQPDIDILPHGDQTQIGERGINLS - GGQRRI 838  
SUR1RatA S SLLLAT LGEMQKVSGAVFWNSNLPDSEGRRPQPPRAQDSWLG YQEQRPRG YASQKPWLLNATVEENITFESPFNKQRYKMVI EACSLQPDIDILPHGDQTQIGERGINLS - GGQRRI 838  
SUR1RatB S SLLLAT LGEMQKVSGAVFWNSNLPDSEGEDPSNPERETAADSDARSRGPVAYASQKPWLLNATVEENITFESPFNKQRYKMVI EACSLQPDIDILPHGDQTQIGERGINLS - GGQRRI 837  
SUR1RatBD31 S SLLLAT LGEMQKVSGAVFWNSNLPDSEGEDPSNPERETAADSDARSRGPVAYASQKPWLLNATVEENITFESPFNKQRYKMVI EACSLQPDIDILPHGDQTQIGERGINLS - GGQRRI 838  
SUR1HumanA S SLLLA ILGEMQKVSGAVFWSSNLPDSEIGEDPSNPERETAADDIRKGPVAYASQKPWLLNATVEENITFESPFNKQRYKMVI EACSLQPDIDILPHGDQTQIGERGINLS - GGQRRI 837  
SUR1HumanB S SLLLA ILGEMQKVSGAVFWSSNLPDSEIGEDPSNPERETAADDIRKGPVAYASQKPWLLNATVEENITFESPFNKQRYKMVI EACSLQPDIDILPHGDQTQIGERGINLS - GGQRRI 837

SUR2ARat CVARALYQNTNIVFLDDPPFSALDIHLS DHLMQEGILKFLQDDKRTVVLVTHKLQYLTHADWIIAMKDGSVLREGTLKD I QTKDVELYEHWKTLMNRQDQLEKDM EADQTTLER - KTLRR 935  
SUR2AMouse CVARALYQNTNIVFLDDPPFSALDIHLS DHLMQEGILKFLQDDKRTVVLVTHKLQYLTHADWIIAMKDGSVLREGTLKD I QTKDVELYEHWKTLMNRQDQLEKDM EADQTTLER - KTLRR 936  
SUR2AHuman CVARALYQNTNIVFLDDPPFSALDIHLS DHLMQEGILKFLQDDKRTVVLVTHKLQYLTHADWIIAMKDGSVLREGTLKD I QTKDVELYEHWKTLMNRQDQLEKDM EADQTTLER - KTLRR 939  
SUR2BMouse CVARALYQNTNIVFLDDPPFSALDIHLS DHLMQEGILKFLQDDKRTVVLVTHKLQYLTHADWIIAMKDGSVLREGTLKD I QTKDVELYEHWKTLMNRQDQLEKDM EADQTTLER - KTLRR 936  
SUR2BHuman CVARALYQNTNIVFLDDPPFSALDIHLS DHLMQEGILKFLQDDKRTVVLVTHKLQYLTHADWIIAMKDGSVLREGTLKD I QTKDVELYEHWKTLMNRQDQLEKDM EADQTTLER - KTLRR 939  
Sur2AMouseD14 CVARALYQNTNIVFLDDPPFSALDIHLS DHLMQEGILKFLQDDKRTVVLVTHKLQYLTHADWIIAMKDGSVLREGTLKD I QTKDVELYEHWKTLMNRQDQLEKDM EADQTTLER - KTLRR 901  
SUR1HaB SVARALYQNTNIVFLDDPPFSALDVHLS DHLMQA GILELLRDDKRTVVLVTHKLQYLPHADWIIAMKDGTIQREGTLKDFQRS E CQLFEHWKTLMNRQDQLEKETVMERKASEPSQGLPR 958  
SUR1HaG CGPEPSTSRPMIFVFLDDPPFSALDVHLS DHLMQA GILELLRDDKRTVVLVTHKLQYLPHADWIIAMKDGTIQREGTLKDFQRS E CQLFEHWKTLMNRQDQLEKETVMERKASEPSQGLPR 958  
SUR1RatA CRPEPSTSTPMIFVFLDDPPFSALDVHLS DHLMQA GILELLRDDKRTVVLVTHKLQYLPHADWIIAMKDGTIQREGTLKDFQRS E CQLFEHWKTLMNRQDQLEKETVMERKASEPSQGLPR 958  
SUR1RatB SVARALYQHNTNIVFLDDPPFSALDVHLS DHLMQA GILELLRDDKRTVVLVTHKLQYLPHADWIIAMKDGTIQREGTLKDFQRS E CQLFEHWKTLMNRQDQLEKETVMERKASEPSQGLPR 957  
SUR1RatBD31 SVARALYQHNTNIVFLDDPPFSALDVHLS DHLMQA GILELLRDDKRTVVLVTHKLQYLPHADWIIAMKDGTIQREGTLKDFQRS E CQLFEHWKTLMNRQDQLEKETVMERKASEPSQGLPR 958  
SUR1HumanA SVARALYQHANTVFLDDPPFSALDIHLS DHLMQA GILELLRDDKRTVVLVTHKLQYLPHADWIIAMKDGTIQREGTLKDFQRS E CQLFEHWKTLMNRQDQLEKETVTERKATEPPQGLSR 957  
SUR1HumanB SVARALYQHANTVFLDDPPFSALDIHLS DHLMQA GILELLRDDKRTVVLVTHKLQYLPHADWIIAMKDGTIQREGTLKDFQRS E CQLFEHWKTLMNRQDQLEKETVTERKATEPPQGLSR 957

SUR2ARat AMYSREAKAQMEDEDEEEEEDEDDNMSTVMRLRTKMPWKT CWYLTSGGFFLLFLMIFSKLLKHSVIVAIDYWLATWTS-----EYSINDPGKADQTFYVAGFSLCGAGIFL 1045  
SUR2AMouse AMYSREAKAQMEDEDEEEEEDEDDNMSTVMRLRTKMPWKT CWYLTSGGFFLLFLMIFSKLLKHSVIVAIDYWLATWTS-----EYSINHPGKADQTFYVAGFSLCGAGIFL 1046  
SUR2AHuman AMYSREAKAQMEDEDEEEEEDEDDNMSTVMRLRTKMPWKT CWRYLTSGGFFLLILMIFSKLLKHSVIVAIDYWLATWTS-----EYSINNTGKADQTFYVAGFSLCGAGIFL 1049  
SUR2BMouse AMYSREAKAQMEDEDEEEEEDEDDNMSTVMRLRTKMPWKT CWYLTSGGFFLLFLMIFSKLLKHSVIVAIDYWLATWTS-----EYSINHPGKADQTFYVAGFSLCGAGIFL 1046  
SUR2BHuman AMYSREAKAQMEDEDEEEEEDEDDNMSTVMRLRTKMPWKT CWRYLTSGGFFLLILMIFSKLLKHSVIVAIDYWLATWTS-----EYSINNTGKADQTFYVAGFSLCGAGIFL 1049  
Sur2AMouseD14 AMYSREAKAQMEDEDEEEEEDEDDNMSTVMRLRTKMPWKT CWYLTSGGFFLLFLMIFSKLLKHSVIVAIDYWLATWTS-----EYSINHPGKADQTFYVAGFSLCGAGIFL 1011  
SUR1HaB AMSRDGLLLDEEEEEAAES EEDDNLSSVLHQRAKIPWRACTKYLSSAGILLSSLLVFSQQLKHMVLAIDYWLAKWTD SALVLSPAARNCSLSQECDLQDSVYAMVFTLLCSLGLIVL 1078  
SUR1HaG AMSRDGLLLDEEEEEAAES EEDDNLSSVLHQRAKIPWRACTKYLSSAGILLSSLLVFSQQLKHMVLAIDYWLAKWTD SALVLSPAARNCSLSQECDLQDSVYAMVFTLLCSLGLIVL 1078  
SUR1RatA AMSRDGLLLDEEEEEAAES EEDDNLSSVLHQRAKIPWRACTKYLSSAGILLSSLLVFSQQLKHMVLAIDYWLAKWTD SALVLSPAARNCSLSQECALDQSVYAMVFTVLC SLGLIAL 1078  
SUR1RatB AMSRDGLLLDEEEEEAAES EEDDNLSSVLHQRAKIPWRACTKYLSSAGILLSSLLVFSQQLKHMVLAIDYWLAKWTD SALVLSPAARNCSLSQECALDQSVYAMVFTVLC SLGLIAL 1077  
SUR1RatBD31 AMSRDGLLLDEEEEEAAES EEDDNLSSVLHQRAKIPWRACTKYLSSAGILLSSLLVFSQQLKHMVLAIDYWLAKWTD SALVLSPAARNCSLSQECALDQSVYAMVFTVLC SLGLIAL 1078  
SUR1HumanA AMSRDGLLQDEEEEEAAES EEDDNLSSMLHQRAEIPWRACAKYLSAGILLSSLLVFSQQLKHMVLAIDYWLAKWTD SALT LTPAARNCSLSQECTLDQTVYAMVFTAVCSLGLIVL 1077  
SUR1HumanB AMSRDGLLQDEEEEEAAES EEDDNLSSMLHQRAEIPWRACAKYLSAGILLSSLLVFSQQLKHMVLAIDYWLAKWTD SALT LTPAARNCSLSQECTLDQTVYAMVFTVLC SLGLIVL 1077

SUR2ARat CLVTSLTVEWMGLTAAKNLHNNLLNKIILGPIRFDDTTPGLILNRFSDNTNIDQHIPPPTLES LRSTLLCLSAIGMISYATPVFLIALAPLGVAFFYFIQKYFRVASKDLQELDDSTQL 1165  
SUR2AMouse CLVTSLTVEWMGLTAAKNLHNNLLNKIILGPIRFDDTTPGLILNRFSDNTNIDQHIPPPTLES LRSTLLCLSAIGMISYATPVFLIALAPLGVAFFYFIQKYFRVASKDLQELDDSTQL 1166  
SUR2AHuman CLVTSLTVEWMGLTAAKNLHNNLLNKIILGPIRFDDTTPGLILNRFSDNTNIDQHIPPPTLES LRSTLLCLSAIGMISYATPVFLIALAPLGVAFFYFIQKYFRVASKDLQELDDSTQL 1169  
SUR2BMouse CLVTSLTVEWMGLTAAKNLHNNLLNKIILGPIRFDDTTPGLILNRFSDNTNIDQHIPPPTLES LRSTLLCLSAIGMISYATPVFLIALAPLGVAFFYFIQKYFRVASKDLQELDDSTQL 1166  
SUR2BHuman CLVTSLTVEWMGLTAAKNLHNNLLNKIILGPIRFDDTTPGLILNRFSDNTNIDQHIPPPTLES LRSTLLCLSAIGMISYATPVFLIALAPLGVAFFYFIQKYFRVASKDLQELDDSTQL 1169  
Sur2AMouseD14 CLVTSLTVEWMGLTAAKNLHNNLLNKIILGPIRFDDTTPGLILNRFSDNTNIDQHIPPPTLES LRSTLLCLSAIGMISYATPVFLIALAPLGVAFFYFIQKYFRVASKDLQELDDSTQL 1131  
SUR1HaB CLVTSVTVEWTGLKVAKRLLHRSLLNRIILAPMRF FETPLGSILNRFSSDCNTIDQHIPSTLECLSRSTLLCVSALTVISYVTPVFLVALPLAVVCYFIQKYFRVASKDLQELDDTTQL 1198  
SUR1HaG CLVTSVTVEWTGLKVAKRLLHRSLLNRIILAPMRF FETPLGSILNRFSSDCNTIDQHIPSTLECLSRSTLLCVSALTVISYVTPVFLVALPLAVVCYFIQKYFRVASKDLQELDDTTQL 1198  
SUR1RatA CLVTSVTVEWTGLKVAKRLLHRSLLNRIILAPMRF FETPLGSILNRFSSDCNTIDQHIPSTLECLSRSTLLCVSALAVISYVTPVFLVALPLAVVCYFIQKYFRVASKDLQELDDTTQL 1198  
SUR1RatB CLVTSVTVEWTGLKVAKRLLHRSLLNRIILAPMRF FETPLGSILNRFSSDCNTIDQHIPSTLECLSRSTLLCVSALAVISYVTPVFLVALPLAVVCYFIQKYFRVASKDLQELDDTTQL 1197  
SUR1RatBD31 CLVTSVTVEWTGLKVAKRLLHRSLLNRIILAPMRF FETPLGSILNRFSSDCNTIDQHIPSTLECLSRSTLLCVSALAVISYVTPVFLVALPLAVVCYFIQKYFRVASKDLQELDDTTQL 1198  
SUR1HumanA CLVTSVTVEWTGLKVAKRLLHRSLLNRIILAPMRF FETPLGSILNRFSSDCNTIDQHIPSTLECLSRSTLLCVSALAVISYVTPVFLVALPLAVVCYFIQKYFRVASKDLQELDDTTQL 1197  
SUR1HumanB CLVTSVTVEWTGLKVAKRLLHRSLLNRIILAPMRF FETPLGSILNRFSSDCNTIDQHIPSTLECLSRSTLLCVSALAVISYVTPVFLVALPLAVVCYFIQKYFRVASKDLQELDDTTQL 1197

SUR2ARat PLLCHFSETAEGLTTRAFRHETRFKQRMLELTDNTNIIAYLFLSAANRWLEVRTDYLGACIVLTASIASISGSSN---SGLVGLGLLYALTITNYLNWVVRNLADLEVQMGAVKKNVS F 1281  
SUR2AMouse PLLCHFSETAEGLTTRAFRHETRFKQRMLELTDNTNIIAYLFLSAANRWLEVRTDYLGACIVLTASIASISGSSN---SGLVGLGLLYALTITNYLNWVVRNLADLEVQMGAVKKNVS F 1282  
SUR2AHuman PLLCHFSETAEGLTTRAFRHETRFKQRMLELTDNTNIIAYLFLSAANRWLEVRTDYLGACIVLTASIASISGSSN---SGLVGLGLLYALTITNYLNWVVRNLADLEVQMGAVKKNVS F 1285  
SUR2BMouse PLLCHFSETAEGLTTRAFRHETRFKQRMLELTDNTNIIAYLFLSAANRWLEVRTDYLGACIVLTASIASISGSSN---SGLVGLGLLYALTITNYLNWVVRNLADLEVQMGAVKKNVS F 1282  
SUR2BHuman PLLCHFSETAEGLTTRAFRHETRFKQRMLELTDNTNIIAYLFLSAANRWLEVRTDYLGACIVLTASIASISGSSN---SGLVGLGLLYALTITNYLNWVVRNLADLEVQMGAVKKNVS F 1285  
Sur2AMouseD14 PLLCHFSETAEGLTTRAFRHETRFKQRMLELTDNTNIIAYLFLSAANRWLEVRTDYLGACIVLTASIASISGSSN---SGLVGLGLLYALTITNYLNWVVRNLADLEVQMGAVKKNVS F 1247  
SUR1HaB PLLSHFAETVEGLTTIRAFRYEARFQKKLEYPDTSNNIASLFLTAANRWLEVRMEYIGACVLLIAAATSISNSLHRELSAGLVGLGLTYALMVSNYLNWVVRNLADMEIQLGAVKRIHAL 1318  
SUR1HaG PLLSHFAETVEGLTTIRAFRYEARFQKKLEYPDTSNNIASLFLTAANRWLEVRMEYIGACVLLIAAATSISNSLHRELSAGLVGLGLTYALMVSNYLNWVVRNLADMEIQLGAVKRIHAL 1318  
SUR1RatA PLLSHFAETVEGLTTIRAFRYEARFQKKLEYPDTSNNIASLFLTAANRWLEVRMEYIGACVLLIAAATSISNSLHRELSAGLVGLGLTYALMVSNYLNWVVRNLADMEIQLGAVKGIHTL 1318  
SUR1RatB PLLSHFAETVEGLTTIRAFRYEARFQKKLEYPDTSNNIASLFLTAANRWLEVRMEYIGACVLLIAAATSISNSLHRELSAGLVGLGLTYALMVSNYLNWVVRNLADMEIQLGAVKGIHTL 1317  
SUR1RatBD31 PLLSHFAETVEGLTTIRAFRYEARFQKKLEYPDTSNNIASLFLTAANRWLEVRMEYIGACVLLIAAATSISNSLHRELSAGLVGLGLTYALMVSNYLNWVVRNLADMEIQLGAVKRIHTL 1280  
SUR1HumanA PLLSHFAETVEGLTTIRAFRYEARFQKKLEYPDTSNNIASLFLTAANRWLEVRMEYIGACVLLIAAATSISNSLHRELSAGLVGLGLTYALMVSNYLNWVVRNLADMEIQLGAVKRIHGL 1317  
SUR1HumanB PLLSHFAETVEGLTTIRAFRYEARFQKKLEYPDTSNNIASLFLTAANRWLEVRMEYIGACVLLIAAATSISNSLHRELSAGLVGLGLTYALMVSNYLNWVVRNLADMEIQLGAVKRIHGL 1317

SUR2ARat LTMESENYEGTMDPSQVPEHWPQEGEIKIHDLCVRYENNLKPVLLKHVKAYIKPGQKVGICGRTGSGKSSLSLAFFRMVDIFDGKVIDGIDISKLPLHLTLRSRLSIIQLQDPILFSGSIRF 1401  
SUR2AMouse LTMESENYEGTMDPSQVPEHWPQEGEIKIHDLCVRYENNLKPVLLKHVKAYIKPGQKVGICGRTGSGKSSLSLAFFRMVDIFDGKVIDGIDISKLPLHLTLRSRLSIIQLQDPILFSGSIRF 1402  
SUR2AHuman LTMESENYEGTMDPSQVPEHWPQEGEIKIHDLCVRYENNLKPVLLKHVKAYIKPGQKVGICGRTGSGKSSLSLAFFRMVDIFDGKVIDGIDISKLPLHLTLRSRLSIIQLQDPILFSGSIRF 1405  
SUR2BMouse LTMESENYEGTMDPSQVPEHWPQEGEIKIHDLCVRYENNLKPVLLKHVKAYIKPGQKVGICGRTGSGKSSLSLAFFRMVDIFDGKVIDGIDISKLPLHLTLRSRLSIIQLQDPILFSGSIRF 1402  
SUR2BHuman LTMESENYEGTMDPSQVPEHWPQEGEIKIHDLCVRYENNLKPVLLKHVKAYIKPGQKVGICGRTGSGKSSLSLAFFRMVDIFDGKVIDGIDISKLPLHLTLRSRLSIIQLQDPILFSGSIRF 1405  
Sur2AMouseD14 LTMESENYEGTMDPSQVPEHWPQEGEIKIHDLCVRYENNLKPVLLKHVKAYIKPGQKVGICGRTGSGKSSLSLAFFRMVDIFDGKVIDGIDISKLPLHLTLRSRLSIIQLQDPILFSGSIRF 1367  
SUR1HaB LKTEAESYEGLLAPSLIPKNWPDQGIQIQNLSVRYDSSLKPVLLKHVNALLISPGQKIGICGRTGSGKSSFLAFFRMVDMFEGRIIDGIDIAKPLHLTLRSRLSIIQLQDPVLFSGTIRF 1438  
SUR1HaG LKTEAESYEGLLAPSLIPKNWPDQGIQIQNLSVRYDSSLKPVLLKHVNALLISPGQKIGICGRTGSGKSSFLAFFRMVDMFEGRIIDGIDIAKPLHLTLRSRLSIIQLQDPVLFSGTIRF 1438  
SUR1RatA LKTEAESYEGLLAPSLIPKNWPDQGIQIQNLSVRYDSSLKPVLLKHVNALLISPGQKIGICGRTGSGKSSFLAFFRMVDMFEGRIIDGIDIAKPLHLTLRSRLSIIQLQDPVLFSGTIRF 1438  
SUR1RatB LKTEAESYEGLLAPSLIPKNWPDQGIQIQNLSVRYDSSLKPVLLKHVNALLISPGQKIGICGRTGSGKSSFLAFFRMVDMFEGRIIDGIDIAKPLHLTLRSRLSIIQLQDPVLFSGTIRF 1437  
SUR1RatBD31 LKTEAESYEGLLAPSLIPKNWPDQGIQIQNLSVRYDSSLKPVLLKHVNALLISPGQKIGICGRTGSGKSSFLAFFRMVDMFEGRIIDGIDIAKPLHLTLRSRLSIIQLQDPVLFSGTIRF 1400  
SUR1HumanA LKTEAESYEGLLAPSLIPKNWPDQGIQIQNLSVRYDSSLKPVLLKHVNALLISPGQKIGICGRTGSGKSSFLAFFRMVDMFEGRIIDGIDIAKPLHLTLRSRLSIIQLQDPVLFSGTIRF 1437  
SUR1HumanB LKTEAESYEGLLAPSLIPKNWPDQGIQIQNLSVRYDSSLKPVLLKHVNALLISPGQKIGICGRTGSGKSSFLAFFRMVDMFEGRIIDGIDIRKPLHLTLRSRLSIIQLQDPVLFSGTIRF 1437

SUR2ARat	NLDPECKCTDDRLWEALEIAQLKNMVKSLPGGLDATVTEGGENFSVGQRQLFCLARAFVRKSSILIMDEATASIDMATENILQKVVMTAFADRTVVVIAHRVSSIMDAGLVLVFSEGILV	1521
SUR2AMouse	NLDPECKCTDDRLWEALEIAQLKNMVKSLPGGLDATVTEGGENFSVGQRQLFCLARAFVRKSSILIMDEATASIDMATENILQKVVMTAFADRTVVVIAHRVSSIVDAGLVLVFSEGILV	1522
SUR2AHuman	NLDPECKCTDDRLWEALEIAQLKNMVKSLPGGLDAVTEGGENFSVGQRQLFCLARAFVRKSSILIMDEATASIDMATENILQKVVMTAFADRTVVVIAHRVSSIMDAGLVLVFSEGILV	1525
SUR2BMouse	NLDPECKCTDDRLWEALEIAQLKNMVKSLPGGLDATVTEGGENFSVGQRQLFCLARAFVRKSSILIMDEATASIDMATENILQKVVMTAFADRTVVVIAHRVHTILTADLVVMKRGNIL	1522
SUR2BHuman	NLDPECKCTDDRLWEALEIAQLKNMVKSLPGGLDAVTEGGENFSVGQRQLFCLARAFVRKSSILIMDEATASIDMATENILQKVVMTAFADRTVVVIAHRVHTILTADLVVMKRGNIL	1525
Sur2AmouseD14	NLDPECKCTDDRLWEALEIAQLKNMVKSLPGGLDATVTEGGENFSVGQRQLFCLARAFVRKSSILIMDEATASIDMATENILQKVVMTAFADRTVVVIAHRVSSIVDAGLVLVFSEGILV	1487
SUR1HaB	NLDPEKCKCSDSTLWEALEIAQLKLVVKALPGGLDAITEGGENFSQGGQRQLFCLARAFVRKTSIFIMDEATASIDMATENILQKVVMTAFADRTVVVIAHRVHTILSADLVMVLKRGAIL	1558
SUR1HaG	NLDPEKCKCSDSTLWEALEIAQLKLVVKALPGGLDAITEGGENFSQGGQRQLFCLARAFVRKTSIFIMDEATASIDMATENILQKVVMTAFADRTVVVIAHRVHTILSADLVMVLKRGAIL	1558
SUR1RatA	NLDPEKCKCSDSTLWEALEIAQLKLVVKALPGGLDAITEGGENFSQGGQRQLFCLARAFVRKTSIFIMDEATASIDMATENILQKVVMTAFADRTVVVIAHRVHTILSADLVMVLKRGAIL	1558
SUR1RatB	NLDPEKCKCSDSTLWEALEIAQLKLVVKALPGGLDAITEGGENFSQGGQRQLFCLARAFVRKTSIFIMDEATASIDMATENILQKVVMTAFADRTVVVIAHRVHTILSADLVMVLKRGAIL	1557
SUR1RatBD31	NLDPEKCKCSDSTLWEALEIAQLKLVVKALPGGLDAITEGGENFSQGGQRQLFCLARAFVRKTSIFIMDEATASIDMATENILQKVVMTAFADRTVVVIAHRVHTILSADLVMVLKRGAIL	1520
SUR1HumanA	NLDPERKCKCSDSTLWEALEIAQLKLVVKALPGGLDAITEGGENFSQGGQRQLFCLARAFVRKTSIFIMDEATASIDMATENILQKVVMTAFADRTVVVIAHRVHTILSADLVVLKRGAIL	1557
SUR1HumanB	NLDPERKCKCSDSTLWEALEIAQLKLVVKALPGGLDAITEGGENFSQGGQRQLFCLARAFVRKTSIFIMDEATASIDMATENILQKVVMTAFADRTVVVIAHRVHTILSADLVVLKRGAIL	1557

SUR2ARat	ECDTGPNLLQHKNGLFSTLVMTNK	1545
SUR2AMouse	ECDTGPNLLQHKNGLFSTLVMTNK	1546
SUR2AHuman	ECDTVPNLFVFAHKNQPFSTLVMTNK	1549
SUR2BMouse	EYDTPESLLAQEDGVFASFVRADM	1546
SUR2BHuman	EYDTPESLLAQENGVFASFVRADM	1549
Sur2AmouseD14	ECDTGPNLLQHKNGLFSTLVMTNK	1511
SUR1HaB	EFDKPELTLSSQKDSVFASFVRADK	1582
SUR1HaG	EFDKPELTLSSQKDSVFASFVRADK	1582
SUR1RatA	EFDKPEKLLSSQKDSVFASFVRADK	1582
SUR1RatB	EFDKPEKLLSSQKDSVFASFVRADK	1581
SUR1RatBD31	EFDKPEKLLSSQKDSVFASFVRADK	1544
SUR1HumanA	EFDKPEKLLSRKDSVFASFVRADK	1581
SUR1HumanB	EFDKPEKLLSRKDSVFASFVRADK	1581

# The Size of a Single Residue of the Sulfonylurea Receptor Dictates the Effectiveness of $K_{ATP}$ Channel Openers

Christophe Moreau,<sup>1</sup> Fabienne Gally, Hélène Jacquet-Bouix,<sup>2</sup> and Michel Vivaudou

*Biophysique Moléculaire and Cellulaire, Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 5090, Commissariat à l'Energie Atomique/Département de Réponse et Dynamique Cellulaire, Grenoble, France*

Received October 26, 2004; accepted December 22, 2004

## ABSTRACT

$K_{ATP}$  channel openers are a diverse group of molecules able to activate ATP-sensitive  $K^+$  channels in a tissue-dependent manner by binding to the channel regulatory subunit, the sulfonylurea receptor (SUR), an ATP-binding cassette protein. Residues crucial to this action were previously identified in the last transmembrane helix of SUR, transmembrane helix 17. This study examined the residue at the most important position, 1253 in the muscle isoform SUR2A and the matching 1290 in the pancreatic/neuronal isoform SUR1 (rat numbering). At this position in either isoform, a threonine enables action of openers, whereas a methionine prohibits it. Using single-point mutagenesis, we have examined the physicochemical basis of this phenomenon and discovered that it relied uniquely on side chain volume and not on shape, polarity, or hydrogen-bonding

capacity of the residue. Moreover, the aromatic nature of neighboring residues conserved in SUR1 and SUR2A was found necessary for SUR2A to sustain the wild-type levels of channel activation by the openers tested, the cromakalim analog SR47063 [4-(2-cyanimino-1,2-dihydro-1-pyridyl)-2,2-dimethyl-6-nitrochromene] and the pinacidil analog P1075 [*N*-cyano-*N'*-(1,1-dimethylpropyl)-*N'*-3-pyridylguanidine]. These observations suggest that these residues can interact with openers via nonspecific stacking interactions provided that the adjacent 1253/1290 residue does not obstruct access. The smaller Thr1253 of SUR2A would permit activation, whereas the bulky Met1290 of SUR1 would not. This hypothesis is discussed in the context of a simple molecular model of transmembrane helix 17.

ATP-sensitive potassium ( $K_{ATP}$ ) channels are inward-rectifying, potassium-selective channels gated by intracellular adenine nucleotides. Because their activity reflects the static and dynamic nature of cellular metabolism (Selivanov et al., 2004), they are thought to act as sensors of intracellular metabolism, tuning the potassium permeability, and in turn the electrical activity, of a cell to its energetic balance.  $K_{ATP}$  channels are present in most excitable cells. In pancreatic  $\beta$  cells, they play a key role in coupling insulin secretion to plasma glucose (Ashcroft, 2000). In heart and brain, their function is still discussed, but evidence supports an implication in the protective response to various metabolic insults

(Zingman et al., 2002; Seino and Miki, 2003; Suzuki et al., 2003).

The  $K_{ATP}$  channel results from the constitutive association of four pore-forming subunits Kir6.x and four regulatory subunits SUR (Inagaki et al., 1995; Shyng and Nichols, 1997). SUR, a member of the ABCC/MRP subfamily of ABC proteins, is the site of action of  $K_{ATP}$  channel openers, a collective term for a large set of chemically diverse, pharmacologically relevant molecules able to activate  $K_{ATP}$  channels (Terzic and Vivaudou, 2001; Mannhold, 2004; Moreau et al., 2005). These openers, which include pinacidil, cromakalim, and nicorandil, preferentially target the SUR2A and SUR2B isoforms predominantly expressed in cardiac muscle and smooth muscle, respectively. Except for the special case of diazoxide (D'hahan et al., 1999b), openers have little or no effects on SUR1-based channels found in pancreas and brain.

This clear phenotypic difference between SUR1 and SUR2 coupled with primary sequence homologies of ~80% permitted the development of chimeric approaches that led to the increasingly detailed identification of the determinants of action of nondiazoxide openers: first, the last transmembrane

C.M. and H.J.-B. were supported by studentships from the Ligue Nationale contre le Cancer and Association pour la Recherche contre le Cancer, respectively. F.G. is supported by a studentship from Commissariat à l'Energie Atomique (program toxicologie nucléaire environnementale).

<sup>1</sup> Current address: IBCP Unité Mixte Recherche 5086 Centre National de la Recherche Scientifique-UCBL, Lyon, France.

<sup>2</sup> Current address: Commissariat à l'Energie Atomique/Cadarache, DEVM-LEMS, Lez Durance, France.

Article, publication date, and citation information can be found at <http://molpharm.aspetjournals.org>.  
doi:10.1124/mol.104.008698.

**ABBREVIATIONS:**  $K_{ATP}$ , ATP-sensitive potassium; SUR, sulfonylurea receptor; ABCC, subfamily C of ATP-binding cassette proteins; MRP, multidrug resistance-associated protein; ABC, ATP-binding cassette; TM, transmembrane; SR47063, 4-(2-cyanimino-1,2-dihydro-1-pyridyl)-2,2-dimethyl-6-nitrochromene; P1075, *N*-cyano-*N'*-(1,1-dimethylpropyl)-*N'*-3-pyridylguanidine.

domain TMD2 (D'hahan et al., 1999a; Fig. 1A); then, two smaller segments within TMD2, the cytoplasmic loop connecting TM helices 13 and 14, and a region encompassing TM helices 16 and 17 and a short segment of NBD2 (Uhde et al., 1999); finally, two residues within TM helix 17 (Leu1249 and Thr1253 in SUR2A, Thr1286 and Met1290 in SUR1) were shown to be necessary (when mutated in SUR2A, loss of opener action ensued) and sufficient since mutation of any of these residues could confer to SUR1 a sensitivity to openers that was either partial in the case of T1286L or equivalent to wild-type SUR2A in the case of M1290T (Moreau et al., 2000).

The broad specificity of SUR2 for openers; the role of TM helix 17, which has been implicated in binding of substrates in other polyspecific ABC transporters such as MRP1 (Daoud et al., 2001; Ito et al., 2001a; Zhang et al., 2001; Mao et al., 2002; Ren et al., 2002; Karwatsky et al., 2003), MRP3 (Oleshuk et al., 2003; Zhang et al., 2003), and multidrug resistance protein 1 (Loo and Clarke 1997, 2001, 2002; Demeule et al., 1998; Dey et al., 1999); and the link between openers and

ATPase activity of SUR2A (Bienengraeber et al., 2000) led to the hypothesis that openers could act as pseudosubstrates of SUR by occupying a substrate-binding pocket structurally conserved in SUR and multidrug resistance proteins.

That single-point mutations in SUR1 can render SUR1/Kir6.2 channels sensitive to openers clearly indicates that SUR1 shares with SUR2A most of the elements of the opener binding site. Indeed, opener binding to SUR1 is detectable, although binding assays showed a 1000- to 10,000-fold difference in dissociation constants for pinacidil, P1075, or levcromakakim between SUR1 and SUR2 isoforms (Schwanstecher et al., 1998). Functional evidence of a low-affinity SUR1 site for nondiazoxide openers has also been presented by Cartier et al. (2003) who observed activation of SUR1-based channels by high concentrations of pinacidil after SUR1 had been mutated (F1388L) in NBD2, a region not thought to be directly involved in opener binding.

In the present work, we have used site-directed mutagenesis to investigate what features of the most important residue of helix 17, SUR2A-Thr1253 or SUR1-Met1290, are necessary for its effect on opener action. We further examine the involvement of neighboring aromatic residues shared by SUR1 and SUR2 in contributing the promiscuous interactions required to accommodate opener molecules of distinct structures.

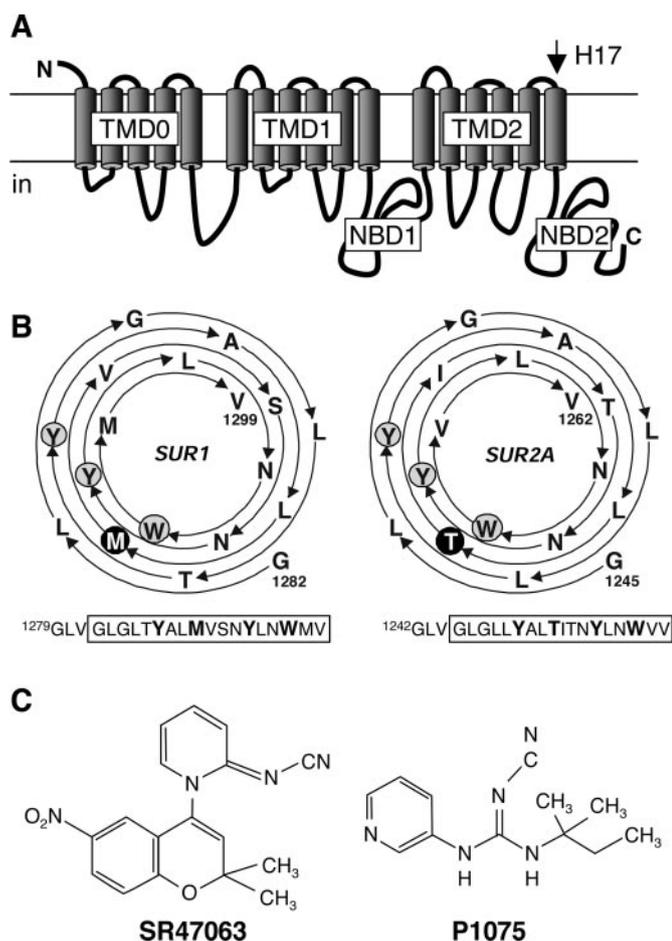
## Materials and Methods

Mouse Kir6.2 (Inagaki et al., 1995; GenBank accession no. D50581), hamster SUR1 (Aguilar-Bryan et al., 1995; GenBank accession no. L40623) and rat SUR2A (Inagaki et al., 1996; GenBank accession no. D83598) were subcloned in the *Xenopus laevis* oocyte expression vectors derived from pGEMHE (Liman et al., 1992). Site-directed mutagenesis was done by polymerase chain reaction amplification of both DNA strands of full-length plasmids with complementary primers mutated to produce the desired amino acid change (QuikChange site-directed mutagenesis kit; Stratagene, La Jolla, CA). Plasmid DNAs were amplified, confirmed by restriction analysis and by sequencing, linearized, and transcribed in vitro using the T7 mMessage mMachin kit (Ambion, Austin, TX). cRNAs were electrophoresed on formaldehyde gels, and concentrations were estimated from two dilutions using RNA marker as a standard.

cRNAs coding Kir6.2 (~2 ng) and wild-type or mutant SURs (~6 ng) were coinjected into defolliculated *X. laevis* oocytes. Injected oocytes were stored at 19°C in Barth's solution [1 mM KCl, 0.82 mM MgSO<sub>4</sub>, 88 mM NaCl, 2.4 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.41 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.3 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, and 16 mM HEPES, pH 7.4] with 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 100 µg/ml gentamycin.

**Electrophysiology.** Three to 7 days after injection, oocytes were devitellinized, and recombinant K<sub>ATP</sub> channels were characterized by the patch-clamp technique in the excised inside-out configuration (Hamill et al., 1981). Patch pipettes (2–10 MΩ) contained 154 mM K<sup>+</sup>, 146 mM Cl<sup>-</sup>, 5 mM Mg<sup>2+</sup>, and 10 mM PIPES, pH 7.1. The cytoplasmic face of the patch was bathed in solutions that all contained 174 mM K<sup>+</sup>, 40 mM Cl<sup>-</sup>, 1 mM EGTA, 1 mM Mg<sup>2+</sup>, and 10 mM PIPES, pH 7.1, and methanesulfonate<sup>-</sup> as the remaining anions. ATP (potassium salt; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), SR47063 (20 mM stock in dimethyl sulfoxide; SANOFI Research Center, Montpellier, France) and P1075 (20 mM stock in dimethyl sulfoxide; Leo Pharmaceutical Products, Copenhagen, Denmark) were added as specified. The membrane potential was maintained at -50 mV. Experiments were conducted at room temperature (22–24°C).

Applications of the various solutions to the intracellular face of the patch was performed using an RSC-100 rapid-solution-changer (Bio-Logic, Claix, France) controlled by in-house software. Analog signals



**Fig. 1.** A, predicted topology of SUR showing the three transmembrane domains (TMD) and two nucleotide-binding domains (NBD). TM helix 17 is indicated. B, helicoidal representation of helix 17 of SUR1 and SUR2A viewed from the extracellular side with key residues circled. SUR1-Met1290 and SUR2A-Thr1253 are white on a black background, whereas neighboring aromatic residues are black on a gray background (SUR1-Tyr1287, Tyr1294, and Trp1297 and SUR2A-Tyr1250, Tyr1257, and Trp1260). The linear sequences are shown at bottom. Numbering refers to the rat/hamster proteins. C, chemical structures of the K<sub>ATP</sub> channel openers used in this study, the benzopyran SR47063 and the guanidine P1075.

were filtered at 300 Hz and sampled at 1 kHz. Slow fluctuations of the no-channel-open baseline of the signal were removed by interactive fitting of the baseline with a spline curve and subtraction of this fit from the signal. Acquisition, analysis, and presentation were performed with in-house software. The tracings shown in the illustrations represent continuous records with occasional short segments of extraneous data removed for display purposes. Results are displayed as mean  $\pm$  S.E.M.

**Molecular Modeling.** The  $\alpha$ -helices were built using the SYBYL software (Tripos, St. Louis, MO) and imported into the ViewerPro software (Accelrys, San Diego, CA) to set the display style. The surface was made in the ViewerPro software with a probe of 1.40 Å rolling over the residues located on the same face of TM helix 17 as residues Thr1253/Met1290. The potassium channel openers were drawn with ChemDraw software (CambridgeSoft, Cambridge, MA), imported in the ViewerPro software and transformed in three-dimensional structures.

## Results

Pursuing a chimeric strategy, we previously identified residues in the last predicted transmembrane helix of SUR, TM helix 17 (Fig. 1A), as responsible for the isoform-specific pharmacological phenotype of  $K_{ATP}$  channels toward  $K_{ATP}$  channel openers (Moreau et al., 2000). In this work, we further explore the chemical basis of this finding through mutagenesis of key residues of TM helix 17 (Fig. 1B).

**Threonine 1253 of SUR2A Is Not Involved in Specific Hydrogen Bonds with  $K_{ATP}$  Channel Openers.** The threonine at position 1253 in SUR2A was previously reported to be necessary and sufficient to confer to SUR2A and SUR1 subunits the capacity to be activated by nondiazoxide openers (Moreau et al., 2000). The amino acid at the equivalent position in SUR1 is a methionine, SUR1-Met1290. The single substitution in SUR2A of threonine 1253 with a methionine (T1253M) is sufficient to abolish the sensitivity to openers such as SR47063 (a cromakalim analog) and P1075 (a pinacidil analog) (Fig. 1C). Likewise, the SUR1(M1290T) mutant is activated by openers, clearly highlighting the critical role of this threonine.

How does a single threonine in TM helix 17 confer sensitivity to openers in both SUR1 and SUR2A isoforms? Contrary to methionines, the threonine side chain has a hydroxyl group that can create intermolecular hydrogen bonds. Thus, threonine 1253 in SUR2A could create specific and critical hydrogen bonds with openers, which would not be possible with methionine 1290 in SUR1.

To test this hypothesis, we substituted SUR2A-Thr1253 with other amino acids of varying size and polarity: two with hydrogen bond-forming side chains of different sizes (serine and tyrosine), two with side chains of medium and small sizes but no capacity to form hydrogen bonds (valine and cysteine), and the last one (methionine) being the aligned residue in SUR1 (Fig. 1).

Each mutant was coexpressed with Kir6.2 in *X. laevis* oocytes, and the opener sensitivity of the resulting  $K_{ATP}$  channels was assessed by the patch-clamp technique in the excised inside-out configuration. The results shown in Fig. 2 demonstrate that mutations of SUR2A-Thr1253 to serine, cysteine, and valine did not significantly affect activation by SR47063 and P1075, whereas mutations to tyrosine and methionine drastically reduced activation.

Thus, even residues with short hydrogen bond-forming

side chains permit activation by openers, whereas substitution with a bigger hydrogen bond-forming side chain (tyrosine) abolishes almost completely the sensitivity to the openers.

Most importantly, the valine mutant SUR2A(T1253V) was also activated by SR47063 and P1075 at the same level as the serine and cysteine mutants. This implies that the hydroxyl group of the 1253 residue is not a critical feature for activation by openers of SUR2A.

Although we did not quantify the on- and off-rates of activation because the speed of solution exchanges at the patch of membrane could not be strictly controlled by our gravity-fed, slow perfusion system, the off-rates of openers seemed somewhat faster for the T1253S and T1253C mutants than for the wild-type channel or for the T1253V mutant (Fig. 2). This was also true of on-rates, but the difference was not as significant.

**Steric Hindrance of the Methionine 1290 Side Chain Prevents Activation of SUR1 by Openers.** The substitution of the SUR2A threonine 1253 with bigger residues apparently induces a steric hindrance, leading to the lack of sensitivity to openers. To confirm that result, we mutated the aligned residue in SUR1, methionine 1290 to serine, cysteine, valine, tyrosine, and threonine and examined the phenotype of these mutants. Figure 3 shows that mutations of methionine 1290 to smaller side chain amino acids (threonine, serine, and cysteine) rendered SUR1 sensitive to SR47063 and P1075, whereas mutation to tyrosine did not. The valine mutant was also constructed, but an unusually low level of expression hampered its characterization. Thus, SUR1 becomes sensitive to openers when residue 1290 has a small side chain irrespective of its polar nature.

**Role of TM Helix 17 Aromatic Residues in  $K_{ATP}$  Channel Activation by Openers.** TM helix 17 of SUR possess three aromatic residues conserved in all SUR isoforms as well as in other members of the MRP/ABCC family. These residues, Tyr1250, Tyr1257, and Trp1260 in SUR2A, are in proximity to Thr1253 (Fig. 1B) and could interact directly with openers through stacking liaisons, because the only common motif among all opener molecules is the presence of at least one heterocycle ring.

To test this hypothesis, the three aromatic residues in SUR2A were replaced by a methionine to preserve the hydrophobicity and the steric hindrance of the side chain while removing the possibility of stacking interactions. Furthermore, the two tyrosines were also mutated to phenylalanines as a positive control for stacking interactions and to determine the possible implication of the tyrosine hydroxyl group in opener action. These mutations were characterized in the same manner as described above, and experimental results are presented in Fig. 4.

None of the aromatic residue mutations completely reduced the SR47063-induced activation (Fig. 4E). However, the sensitivity for this opener was drastically reduced for the Y1250M mutant (compare traces of Figs. 2A and 4B), whereas it was only slightly reduced for the Y1250F mutant compared with wild type. A similar, but smaller, difference toward SR47063 was seen between the Y1257F and Y1257M mutants. This difference is seen at 10  $\mu$ M SR47063, which activated the Y1257F mutant less than wild type and more than the Y1257M mutant. In contrast, the W1260M

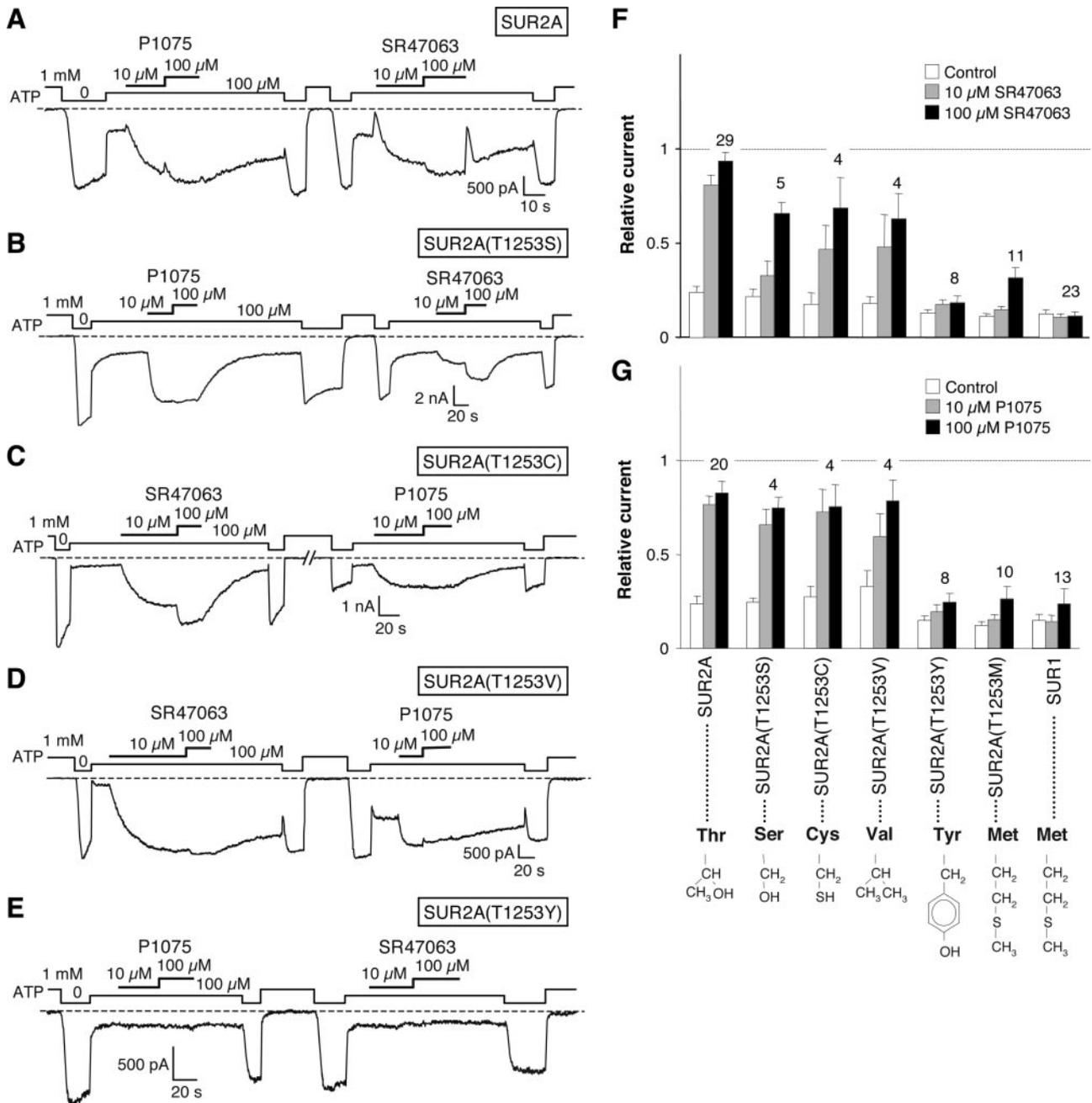
mutation, which reduces side chain size and eliminates aromaticity, had little effect on SR47063 sensitivity.

The responses to P1075 of the same mutants are summarized in Fig. 4F. The pattern of sensitivity to P1075 of the tyrosine mutants seems comparable with that observed with SR47063. Thus, the phenylalanine mutants of the residues Tyr1250 and Tyr1257 had the same phenotypes as wild-type SUR2A, whereas the methionine mutants displayed a reduced sensitivity to P1075 as evidenced by the much smaller activation elicited by the 10  $\mu$ M concentration. Thus, the aromatic rings of both tyrosines seem to influence the acti-

vation threshold of both P1075 and SR47063. In contrast, the mutation of tryptophan 1260 to methionine reduced the level of activation by P1075 but not by SR47063 as evidenced in the patch-clamp record of Fig. 4D.

### Discussion

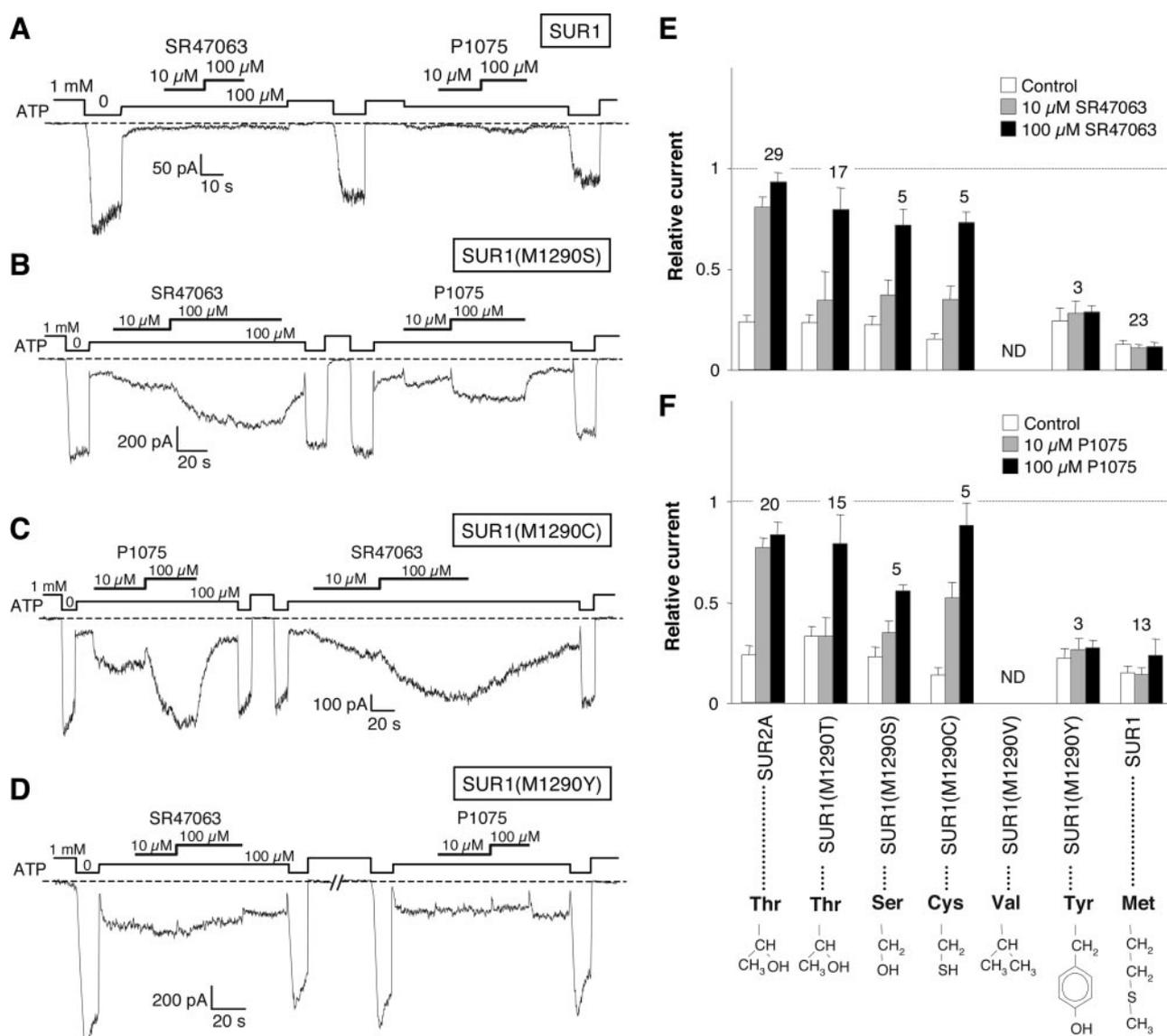
**Difference in Side Chain Size of SUR2A-Thr1253 and SUR1-Met1290 as a Critical Factor in the Effects of K<sub>ATP</sub> Channel Openers.** We have previously shown that the different pharmaceutical phenotypes of channels



**Fig. 2.** Presence of large residues at position 1253 of SUR2A correlates with a reduction in activation by K<sub>ATP</sub> channel openers. The responses of wild-type and mutated SUR2A to the openers SR47063 and P1075 were investigated by recording ATP-sensitive K<sup>+</sup> currents at -50 mV from inside-out patches of *X. laevis* oocytes expressing Kir6.2 and each SUR subunit. A to E, examples of individual records for the indicated SUR subunits. F and G, average relative currents measured before and during application of the specified openers. Currents were averaged after being normalized to the current measured in absence of ATP in each patch. The data were collected from the indicated number of patches where the protocols of A were used.

incorporating the isoforms SUR1 and SUR2A could be attributed in great part to the presence of distinct amino acids at two positions within the last postulated transmembrane helix of SUR. These were positions 1286 and 1290 in SUR1 (and the equivalent positions 1249 and 1253 in SUR2A). The former position, however, was of lesser importance because its mutation in SUR1 could confer a weak sensitivity to SR47063 but not to the other openers tested, P1075 and rilmakalim (Moreau et al., 2000); we have concentrated here on the latter position. A threonine at this position, as in wild-type SUR2A, greatly increases sensitivity to openers, whereas a methionine, as in wild-type SUR1, greatly decreases it. What specific physicochemical properties of threonine and methionine could be responsible for their effects? We have tried to answer that question by mutating Thr1253 in SUR2A and Met1290 in SUR1 to residues of various shapes, sizes, and polarities and by registering the responses

of the resulting mutant  $K_{ATP}$  channels to the openers SR47063 and P1075. The selected mutations were tested in two different contexts to fully validate their effects: in SUR1, where they caused no change or a gain of function, and in SUR2A, where they caused no change or a loss of function. The results for SUR1 and SUR2A were remarkably concordant and led to the conclusion that residue size mattered most. Thus, SUR1 became opener-activatable when the residue at position 1290 was more compact than methionine, and SUR2A lost its opener sensitivity when the residue at position 1253 was a methionine or a bulkier residue. Thus, opener-permissive residues included not only threonine, a hydrophilic residue able to form hydrogen bonds, but also serine, which has similar properties but is smaller, cysteine, which has comparable size but is unable to form hydrogen bonds, and valine, which has comparable size but is hydrophobic and unable to form hydrogen bonds. Nonpermissive



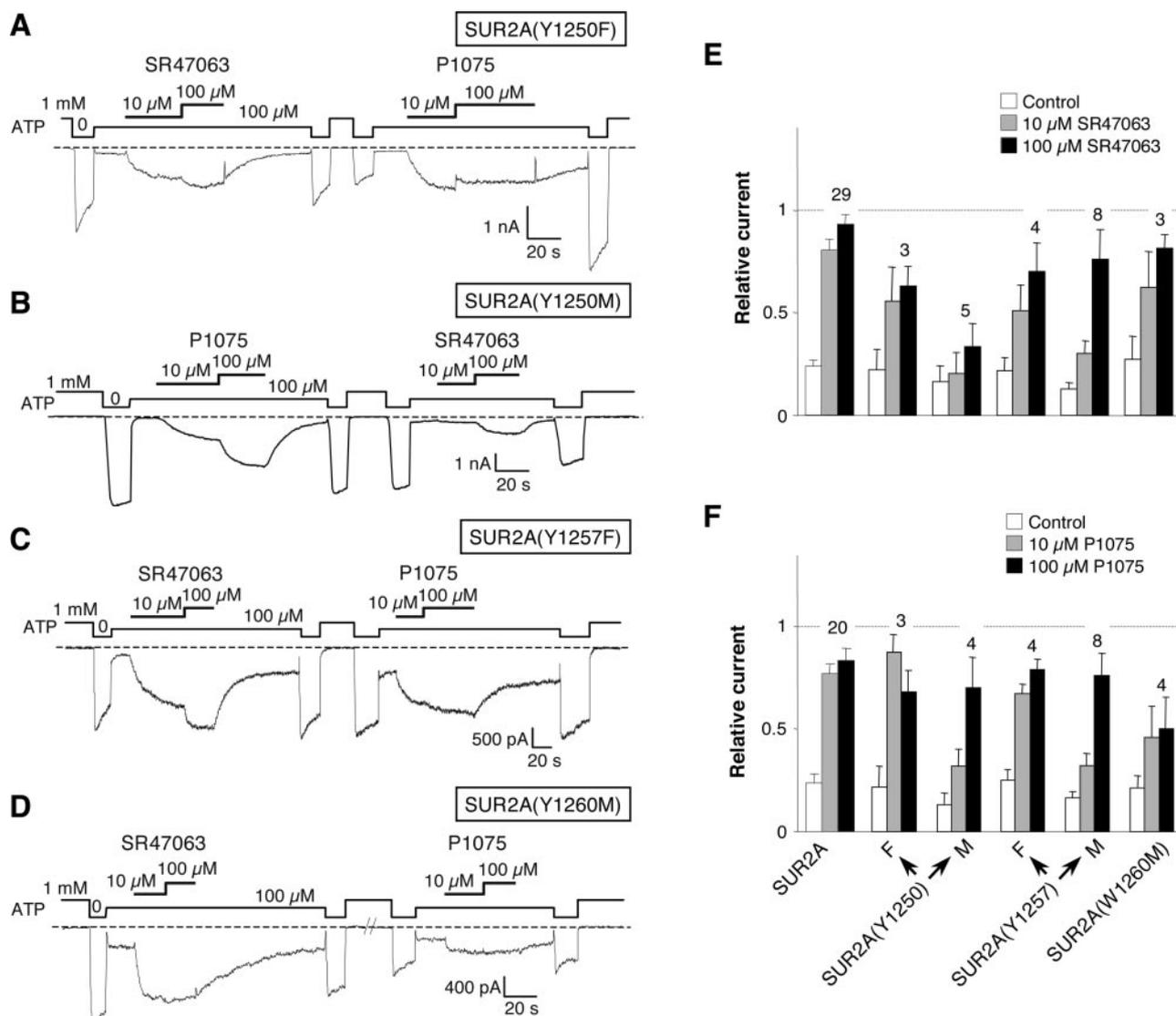
**Fig. 3.** Presence of small residues at position 1290 of SUR1 correlates with an increased sensitivity to activation by openers. The responses of wild-type and mutated SUR1 to SR47063 and P1075 were investigated by recording ATP-sensitive  $K^+$  currents at  $-50$  mV from inside-out patches of *X. laevis* oocytes expressing Kir6.2 and each SUR subunit. A to D, examples of individual records for the indicated SUR subunits. E and F, average relative currents measured before and during application of the specified openers. Currents were averaged after being normalized to the current measured in absence of ATP in each patch. The data were collected from the indicated number of patches where the protocols of A were used. Responses of the mutant SUR1(M1290V) were not determined (ND) because of low levels of expression.

residues included the large hydrophobic methionine and the large hydrophilic tyrosine.

These observations point to side chain size as the only determinant of opener sensitivity and argue against any intimate physical contact between SUR2A-Thr1253 and openers during binding. They suggest that this key residue could act as a gate toward the binding site, in agreement with the faster dissociation rates observed when Thr1253 was mutated to the smaller serine and cysteine residues, but not to the valine residue of similar volume.

**Opener Action Is Modulated by TM Helix 17 Aromatic Residues.** SUR1-Met1290 and SUR2A-Thr1253 are critical residues for the specificity of action of openers; however, the above-mentioned results clearly indicate that they do not participate in direct interactions with them. Nonetheless, binding and electrophysiological studies (D'hahan et al., 1999a; Uhde et al., 1999; Moreau et al., 2000) are in favor of an opener binding site including helix 17, with the likely involvement of other regions such as the intracellular loop between transmembrane

helices 13 and 14 (Uhde et al., 1999). Focusing our research on helix 17, we looked at three aromatic residues predicted to lie in space near SUR2A-Thr1253. These residues, SUR2A-Tyr1250, -Tyr1257, and -Trp1260, are absolutely conserved in all SUR isoforms and are also found in most ABC transporters of the ABCC/MRP subfamily. To examine whether they could create nonspecific stacking interactions with the aromatic rings present in opener molecules, we substituted them with a methionine, a nonaromatic hydrophobic residue of similar size. The effects of these mutations were not as clear-cut as the all-or-nothing effects of the mutations of SUR1-Met1290 and SUR2A-Thr1253. All mutants displayed sensitivity to the two openers tested, but there was a definite reduction in sensitivity when either tyrosine 1250 or 1257 was changed to methionine. This was not seen when tyrosines were changed to phenylalanine, suggesting that aromaticity of these residues is crucial. This was not the case for tryptophan 1260, which could be mutated to methionine without affecting activation by SR47063.



**Fig. 4.** Effects of mutating conserved aromatic residues of SUR2A helix 17 on the sensitivity to K<sub>ATP</sub> channel openers. A to D, patch-clamp records illustrating the responses to the openers SR47063 and P1075 of channels formed with Kir6.2 and the specified SUR2A mutant. E and F, average relative currents measured before and during application of the specified openers. Currents were averaged after being normalized to the current measured in absence of ATP in each patch. The data were collected from the indicated number of patches where the protocols of A were used.

However, it clearly seems that mutations of the aromatic residues induce differential effect on activation by the two openers. The SUR2A-Y1250M mutation reduced the activation by SR47063 much more than that by P1075, whereas the SUR2A-W1260M affected only the activation by P1075. These effects are concordant with the substrate-specific phenotypes observed with MRP1 and MRP2 when the residues aligned to SUR2A-Trp1260, MRP1-Trp1246, and MRP2-Trp1254 were mutated (Ito et al., 2001a,b).

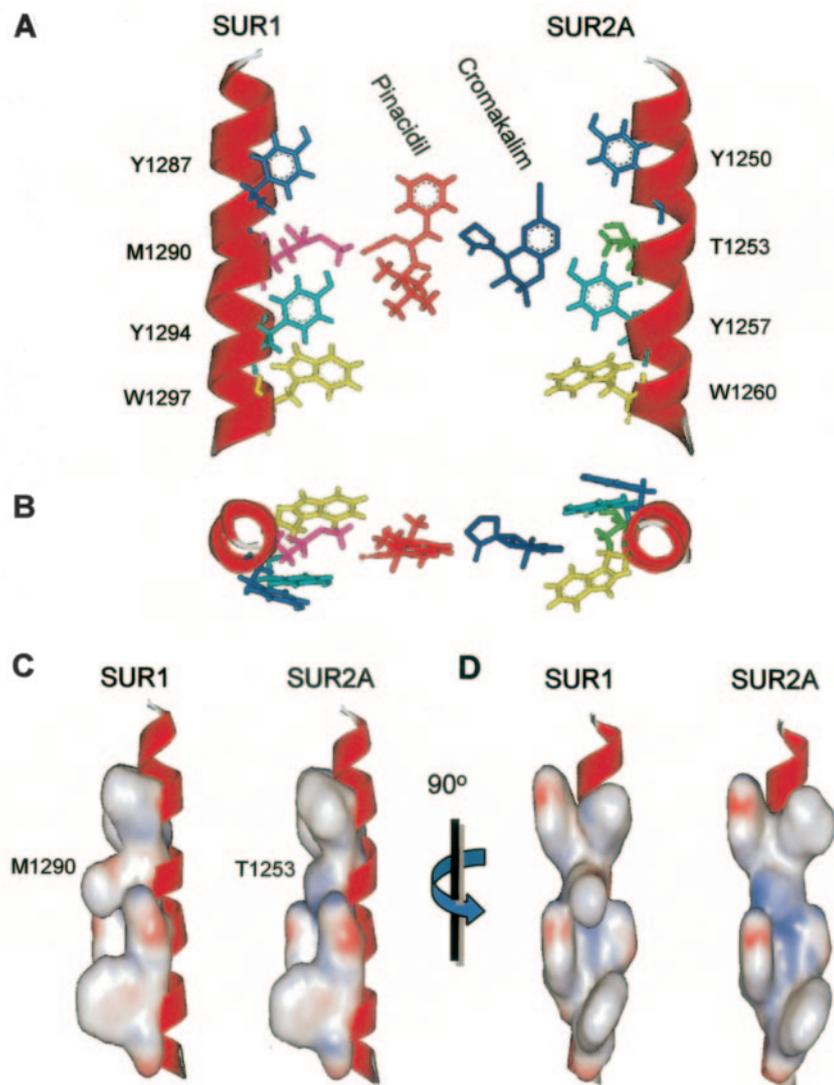
These observations indicate that aromatic residues of helix 17 interact with openers and that these interactions depend on the structure of the openers, as if these residues were part of a binding pocket accessible to various openers.

**Modeling the Interaction of Openers with Helix 17.** The evidence presented asserts the fundamental role of TM helix 17 in controlling the activation of  $K_{ATP}$  channels by openers. One residue, SUR1-Met1290 or SUR2A-Thr1253, acts as a size-dependent on/off switch, whereas neighboring aromatic residues modulate that activation.

How can the size, but not the shape or polarity, of the side chain of residues at the equivalent position in the last SUR1 and SUR2A transmembrane helix affect so drastically the sensitivity to openers? Besides a complex allosteric effect

linking this residue to a distant site shared by SUR1 and SUR2A, the simplest hypothesis may be that the steric hindrance of the SUR1-Met1290 side chain directly prevents openers from reaching a nearby binding site. This site could be partly constituted of aromatic residues contributing  $\pi$ - $\pi$  stacking interactions, which would be sufficiently aspecific to confer a broad tolerance for molecules of diverse structures (Pawagi et al., 1994). A hypothetical molecular representation of TM helix 17 (Fig. 5) reveals that such a scheme would fit well within the constraints imposed by the primary sequence and the sizes of residue side chains as well as of openers.

To date, high-resolution structural information on the transmembrane spanning domains of eukaryotic ABC transporters is not available, and consequently, the orientation of SUR1-Met1290 and SUR2A-Thr1253 is unknown. However, models can be created using the published crystal coordinates of the bacterial ABC transporters MsbA and BtuCD (Chang and Roth, 2001; Löcher et al., 2002; Chang, 2003). An MsbA-based model of the transmembrane domains of MRP1, an ABC transporter highly homologous to SUR, was recently developed (Campbell et al., 2004). In that study, several aromatic residues were predicted to face the substrate



**Fig. 5.** Hypothetical model of the molecular interactions between helix 17 of SUR1 and SUR2A with openers. A, side view of TM helix 17 of SUR1 and SUR2A with stick representation of salient residues and of the model openers cromakalim (in dark blue) and pinacidil (in red), from which SR47063 and P1075 were derived. B, top view from the extracellular side of the same. C and D, molecular surface rendering of helix 17 of SUR1 and SUR2A from 2 orthogonal points of view. Key residues Met1290 and Thr1253 are labeled. Surface colors reflect the electrostatic potential of calculated Gasteiger charges.

translocation pathway, and experimental assays confirmed that prediction by demonstrating their critical role in substrate transport. Among these residues, MRP1-Trp1246 matches SUR1-Trp1297 and SUR2A-Trp1260. Thus, according to this MRP1 model, because these tryptophan residues are located on the same face of helix 17 as SUR1-Met1290 and SUR2A-Thr1253 (Fig. 1), their side chains would all be facing inward within a potential central substrate pocket. This would be consistent with a role for SUR1-Met1290 in obstructing access of openers to interacting residues common to SUR1 and SUR2A such as the aromatic residues tested.

#### Acknowledgments

We are grateful to Dr. J. Bryan (Houston, TX) for hamster SUR1, Dr. S. Seino (Chiba, Japan) for mouse Kir6.2 and rat SUR2A, Dr. P. Gautier (SANOFI Research Center) for SR 47063, and Dr. L. Bill-eurp (Leo Pharmaceutical Products) for P1075.

#### References

- Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Wechsler SW, Clement JP, Boyd AE, Gonzalez G, Herrerasosa H, Nguy K, Bryan J, and Nelson DA (1995) Cloning of the  $\beta$  cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science (Wash DC)* **268**:423–426.
- Ashcroft SJH (2000) The beta-cell K<sub>ATP</sub> channel. *J Membr Biol* **176**:187–206.
- Bienengraeber M, Alekseev AE, Abraham MR, Carrasco AJ, Moreau C, Vivaudou M, Dzeja PP, and Terzic A (2000) ATPase activity of the sulfonylurea receptor: a catalytic function for the K<sub>ATP</sub> channel complex. *FASEB J* **14**:1943–1952.
- Campbell JD, Koike K, Moreau C, Sansom MSP, Deeley RG, and Cole SPC (2004) Molecular modeling correctly predicts the functional importance of Phe<sup>594</sup> in transmembrane helix 11 of the multidrug resistance protein, MRP1 (ABCC1). *J Biol Chem* **279**:463–468.
- Cartier EA, Shen S, and Shyng SL (2003) Modulation of the trafficking efficiency and functional properties of ATP-sensitive potassium channels through a single amino acid in the sulfonylurea receptor. *J Biol Chem* **278**:7081–7090.
- Chang G (2003) Structure of MsbA from *Vibrio cholerae*: a multidrug resistance ABC transporter homolog in a closed conformation. *J Mol Biol* **330**:419–430.
- Chang G and Roth CB (2001) Structure of MsbA from *E. coli*: a homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters. *Science (Wash DC)* **293**:1793–1800.
- Daoud R, Julien M, Gros P, and Georges E (2001) Major photoaffinity drug binding sites in multidrug resistance protein 1 (MRP1) are within transmembrane domains 10–11 and 16–17. *J Biol Chem* **276**:12324–12330.
- Demeule M, Laplante A, Murphy GF, Wenger RM, and Beliveau R (1998) Identification of the cyclosporin-binding site in P-glycoprotein. *Biochemistry* **37**:18110–18118.
- Dey S, Hafkemeyer P, Pastan I, and Gottesman MM (1999) A single amino acid residue contributes to distinct mechanisms of inhibition of the human multidrug transporter by stereoisomers of the dopamine receptor antagonist flupentixol. *Biochemistry* **38**:6630–6639.
- D'hahan N, Jacquet H, Moreau C, Catty P and Vivaudou M (1999a) A transmembrane domain of the sulfonylurea receptor mediates activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels by K<sup>+</sup> channel openers. *Mol Pharmacol* **56**:308–315.
- D'hahan N, Moreau C, Prost AL, Jacquet H, Alekseev AE, Terzic A, and Vivaudou M (1999b) Pharmacological plasticity of cardiac ATP-sensitive potassium channels toward diazoxide revealed by ADP. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**:12162–12167.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, and Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflueg Arch Eur J Physiol* **391**:85–100.
- Inagaki N, Gonoï T, Clement JP, Namba N, Inazawa J, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L, Seino S, and Bryan J (1995) Reconstitution of I-KATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science (Wash DC)* **270**:1166–1170.
- Inagaki N, Gonoï T, Clement JP, Wang CZ, Aguilar-Bryan L, Bryan J, and Seino S (1996) A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Neuron* **16**:1011–1017.
- Ito KI, Oleschuk CJ, Westlake C, Vasa MZ, Deeley RG and Cole SP (2001a) Mutation of Trp1254 in the multispecific organic anion transporter, multidrug resistance protein 2 (MRP2) (ABCC2), alters substrate specificity and results in loss of methotrexate transport activity. *J Biol Chem* **276**:38108–38114.
- Ito KI, Olsen SL, Qiu W, Deeley RG, and Cole SPC (2001b) Mutation of a single conserved tryptophan in multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1) results in loss of drug resistance and selective loss of organic anion transport. *J Biol Chem* **276**:15616–15624.
- Karwatsky J, Daoud R, Cai J, Gros P, and Georges E (2003) Binding of a photoaffinity analogue of glutathione to MRP1 (ABCC1) within two cytoplasmic regions (L0 and L1) as well as transmembrane domains 10–11 and 16–17. *Biochemistry* **42**:3286–3294.
- Liman ER, Tytgat J, and Hess P (1992) Subunit stoichiometry of a mammalian K<sup>+</sup> channel determined by construction of multimeric cDNAs. *Neuron* **9**:861–871.
- Löcher KP, Lee AT, and Rees DC (2002) The E-coli BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science (Wash DC)* **296**:1091–1098.
- Loo TW and Clarke DM (1997) Identification of residues in the drug-binding site of human P-glycoprotein using a thiol-reactive substrate. *J Biol Chem* **272**:31945–31948.
- Loo TW and Clarke DM (2001) Defining the drug-binding site in the human multidrug resistance P-glycoprotein using a methanethiosulfonate analog of verapamil, MTS-verapamil. *J Biol Chem* **276**:14972–14979.
- Loo TW and Clarke DM (2002) Location of the rhodamine-binding site in the human multidrug resistance P-glycoprotein. *J Biol Chem* **277**:44332–44338.
- Mannhold R (2004) K<sub>ATP</sub> channel openers: structure-activity relationships and therapeutic potential. *Med Res Rev* **24**:213–266.
- Mao QC, Qiu W, Weigl KE, Lander PA, Tabas LB, Shepard RL, Dantzig AH, Deeley RG, and Cole SPC (2002) GSH-dependent photolabeling of multidrug resistance protein MRP1 (ABCC1) by [<sup>125</sup>I]LY475776. Evidence of a major binding site in the COOH-proximal membrane spanning domain. *J Biol Chem* **277**:28690–28699.
- Moreau C, Jacquet H, Prost AL, D'hahan N, and Vivaudou M (2000) The molecular basis of the specificity of action of K<sub>ATP</sub> channel openers. *EMBO (Eur Mol Biol Organ) J* **19**:6644–6651.
- Moreau C, Prost AL, Derand R, and Vivaudou M (2005) SUR, ABC proteins targeted by K<sub>ATP</sub> channel openers. *J Mol Cell Cardiol*, in press.
- Oleschuk CJ, Deeley RG, and Cole SPC (2003) Substitution of Trp(1242) of TM17 alters substrate specificity of human multidrug resistance protein 3. *Am J Physiol* **284**:G280–G289.
- Pawagi AB, Wang J, Silverman M, Reithmeier RA, and Deber CM (1994) Transmembrane aromatic amino acid distribution in P-glycoprotein. A functional role in broad substrate specificity. *J Mol Biol* **235**:554–564.
- Ren XQ, Furukawa T, Aoki S, Sumizawa T, Haraguchi M, Nakajima Y, Ikeda R, Kobayashi M, and Akiyama S (2002) A positively charged amino acid proximal to the C-terminus of TM17 of MRP1 is indispensable for GSH-dependent binding of substrates and for transport of LTC<sub>4</sub>. *Biochemistry* **41**:14132–14140.
- Schwanstecher M, Sieverding C, Dorschner H, Gross I, Aguilar-Bryan L, Schwanstecher C, and Bryan J (1998) Potassium channel openers require ATP to bind to and act through sulfonylurea receptors. *EMBO (Eur Mol Biol Organ) J* **17**:5529–5535.
- Seino S and Miki T (2003) Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Prog Biophys Mol Biol* **81**:133–176.
- Selivanov VA, Alekseev AE, Hodgson DM, Dzeja PP, and Terzic A (2004) Nucleotide-gated K<sub>ATP</sub> channels integrated with creatine and adenylate kinases: amplification, tuning and sensing of energetic signals in the compartmentalized cellular environment. *Mol Cell Biochem* **256**:243–256.
- Shyng SL and Nichols CG (1997) Octameric stoichiometry of the K<sub>ATP</sub> channel complex. *J Gen Physiol* **110**:655–664.
- Suzuki M, Saito T, Sato T, Tamagawa M, Miki T, Seino S, and Nakaya H (2003) Cardioprotective effect of diazoxide is mediated by activation of sarcolemmal but not mitochondrial ATP-sensitive potassium channels in mice. *Circulation* **107**:682–685.
- Terzic A and Vivaudou M (2001) Molecular pharmacology of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels: how and why? in *Potassium Channels in Cardiovascular Biology* (Archer SL and Rusch NJ eds) pp 257–277, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Uhde I, Toman A, Gross I, Schwanstecher C, and Schwanstecher M (1999) Identification of the potassium channel opener site on sulfonylurea receptors. *J Biol Chem* **274**:28079–28082.
- Zhang DW, Cole SPC, and Deeley RG (2001) Identification of a nonconserved amino acid residue in multidrug resistance protein 1 important for determining substrate specificity: evidence for functional interaction between transmembrane helices 14 and 17. *J Biol Chem* **276**:34966–34974.
- Zhang DW, Gu HM, Vasa M, Muredda M, Cole SPC, and Deeley RG (2003) Characterization of the role of polar amino acid residues within predicted transmembrane helix 17 in determining the substrate specificity of multidrug resistance protein 3. *Biochemistry* **42**:9989–10000.
- Zingman LV, Hodgson DM, Bast PH, Kane GC, Perez-Terzic C, Gumina RJ, Pucar D, Bienengraeber M, Dzeja PP, Miki T, et al. (2002) Kir6.2 is required for adaptation to stress. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:13278–13283.

**Address correspondence to:** Dr. Michel Vivaudou, CEA/DRDC-BMC, 17 rue des Martyrs, 38054, Grenoble, France. E-mail: vivaudou@cea.fr