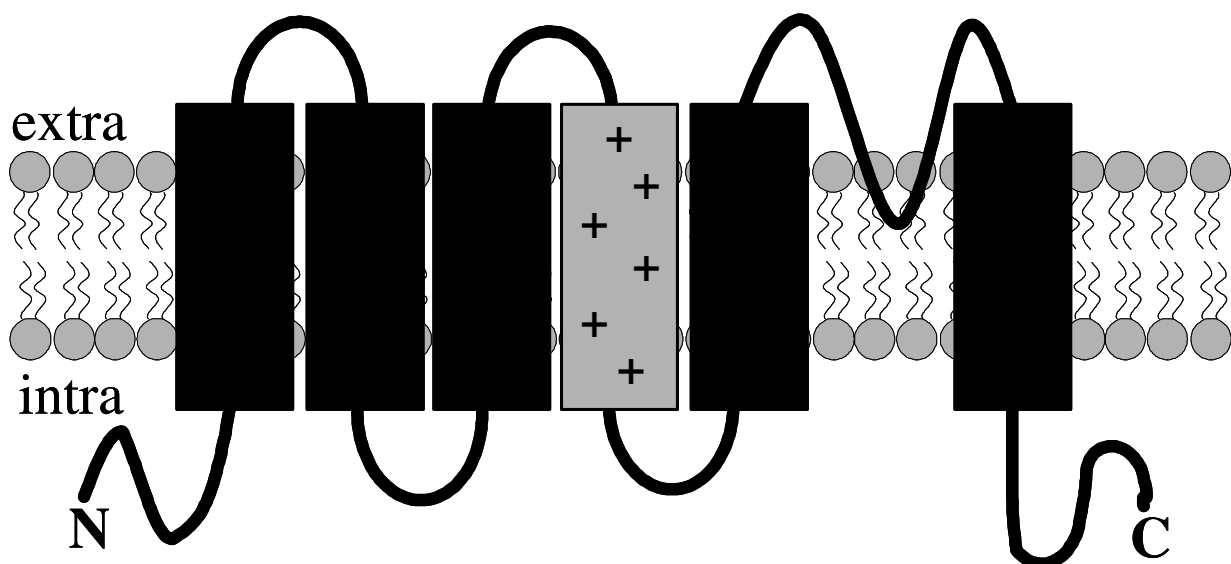


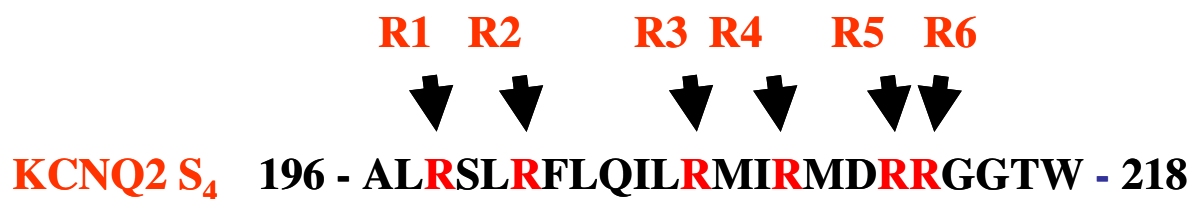
I geni *kcnq2* e *kcnq3* codificano per subunità canale espresse principalmente a livello neuronale; assemblandosi in maniera omo- e/o eterotetramerica, tali subunità formano canali del potassio voltaggio-dipendenti che costituiscono la base molecolare della corrente M, una corrente ripolarizzante che regola il potenziale di membrana e, quindi, l'eccitabilità neuronale. Infatti, mutazioni in tali geni (più frequentemente nel gene *kcnq2*) sono state associate ad una forma di epilessia neonatale, detta BFNS (*Benign Familial Neonatal Seizures*), che si manifesta essenzialmente durante il primo anno di vita, ma che si può associare in età adulta ad altre forme di epilessia, rivelando una latente predisposizione a manifestazioni da ipereccitabilità neuronale.

Come schematizzato in Fig. 1, strutturalmente tali subunità sono costituite da sei segmenti transmembrana (denominati da S<sub>1</sub> ad S<sub>6</sub>) ed entrambe le estremità N- e C-terminale a livello intracitoplasmatico:



**Fig. 1.** Topologia di una subunità KCNQ2.

Le subunità S<sub>5</sub> ed S<sub>6</sub> insieme all'ansa di connessione formano il poro e sono responsabili, dunque, della selettività ionica del canale, mentre i segmenti da S<sub>1</sub> ad S<sub>4</sub> formano il cosiddetto sensore del voltaggio (o VSD, Voltage Sensing Domain), innescando le variazioni conformazionali che, in risposta a modifiche del potenziale di membrana, causano l'apertura o la chiusura del canale stesso. Tale proprietà di voltaggio-dipendenza è conferita principalmente dalla presenza di cariche positive presenti nel quarto segmento transmembrana (Fig. 2):



**Fig. 2.** Sequenza aminoacidica del segmento S<sub>4</sub> della subunità KCNQ2 ed indicazione dei residui di arginina presenti.

Secondo il modello più accreditato, in condizioni di riposo della membrana tali residui di arginina sono neutralizzati da cariche negative presenti in altri aminoacidi della proteina canale: in risposta ad uno stimolo depolarizzante, tali interazioni elettrostatiche vengono destabilizzate allontanando il segmento S<sub>4</sub>, carico positivamente, dall'ambiente intracellulare ed innescando le transizioni conformazionali che determineranno la transizione del canale nella configurazione aperta: il tipo di movimento del segmento S<sub>4</sub> all'interno della membrana e l'entità di tale spostamento durante uno stimolo depolarizzante (nonché durante uno stimolo ripolarizzante, che riporta il canale nella configurazione chiusa) è ancora oggetto di intenso dibattito internazionale.

Ad oggi, inoltre, non è noto il ruolo svolto da ciascuna arginina nel processo di attivazione (o *gating*) del canale preliminare all'apertura del poro e, a tale scopo, nel

laboratorio nel quale lavoro sono stati preparati dei costrutti mutanti, in cui ciascun residuo di arginina presente nell'S<sub>4</sub> veniva separatamente sostituito da un residuo di glutammina. I costrutti così ottenuti sono stati utilizzati per trasfezioni transienti di cellule ovariche di criceto cinese (CHO) utilizzando il reagente cationico Lipofectamina (*invitrogen*), utilizzate per lo studio elettrofisiologico delle subunità canale così mutate mediante la tecnica di *patch-clamp* in configurazione *whole-cell*. L'analisi funzionale di tali costrutti ha rivelato che i canali incorporanti tali mutazioni risultavano funzionali, ma con chiare alterazioni del meccanismo di *gating* del canale: alcune mutazioni, infatti, determinavano l'apertura del canale a potenziale più iperpolarizzati rispetto al canale *wild-type*, mentre altre verso potenziali più depolarizzanti.

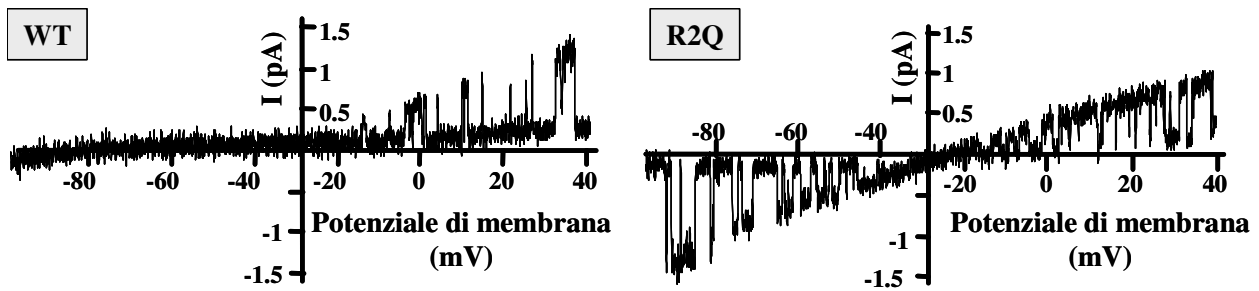
In particolare, il canale incorporante la mutazione che neutralizza il secondo residuo di arginina presente nel segmento S<sub>4</sub> (R2Q) elicitava delle correnti voltaggio-indipendenti nell'intervallo di potenziali utilizzato: il canale, infatti, pur conservando la selettività per lo ione potassio (come evinto dal potenziale di reversione della corrente misurata), non mostrava la dipendenza dell'attivazione da un potenziale soglia, ma conduceva correnti sia in direzione entrante che uscente a seconda del potenziale applicato; inoltre, mentre le subunità KCNQ2 *wild-type* hanno tipicamente delle cinetiche di attivazione e di deattivazione molto lente, le correnti elicitate dai canali incorporanti la mutazione R2Q mostravano delle cinetiche molto rapide.

Tali profonde alterazioni funzionali delle correnti elicitate dalle subunità KCNQ2 indotte dalla mutazione R2Q ci hanno spinto ad approfondire lo studio di tale canale mutante mediante studi di registrazioni elettrofisiologiche di singolo canale. A tale scopo, in collaborazione con il prof. M. S. Shapiro del Dipartimento di Fisiologia dell'Università UTHSCSA di San Antonio (Texas, USA), abbiamo trasfettate in maniera transiente cellule CHO mediante il reagente cationico Polifect (Qiagen) che risulta essere meno tossico della Lipofectamina e che permette, dunque, di registrare le cellule 48-72 ore dopo le trasfezioni, come richiesto dalla tecnica di registrazione di singolo canale in configurazione *cell-attached*, una modalità di

registrazione che risulta essere la più conservativa del *milieu* intracellulare e dell'apparato biochimico di modulazione associato al canale.

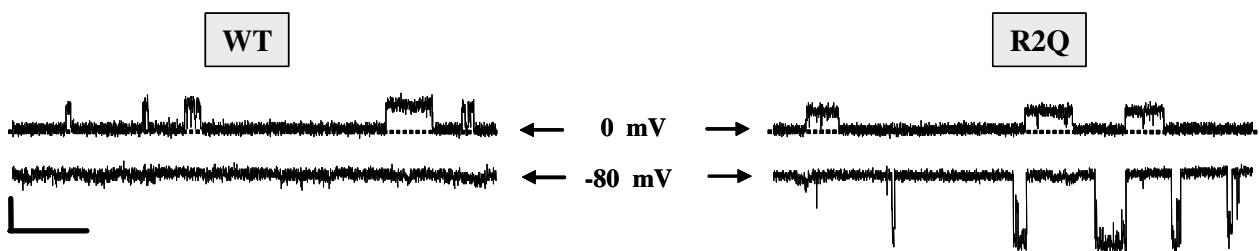
Per effettuare tali esperimenti, è stata utilizzata una soluzione di perfusione costituita da (in mM): 175 KCl, 4 MgCl<sub>2</sub>, e 10 HEPES; il valore di pH della soluzione veniva aggiustato a 7.4 mediante KOH. Inoltre, sono state utilizzate delle pipette di vetro tirate al calore ed aventi una resistenza di circa 7-15 MΩ quando riempite con una soluzione contenente (in mM): 105 NaCl, 50 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, e 10 HEPES; il valore di pH della soluzione veniva aggiustato a 7.4 mediante NaOH. Tale soluzione contiene una concentrazione di ioni K<sup>+</sup> molto più alta rispetto alla soluzione generalmente utilizzata per registrazioni elettrofisiologiche delle subunità KCNQ2 (circa 5 mM K<sup>+</sup>): in tal modo, il potenziale di reversione del canale veniva spostato da -90 a -30 mV circa, permettendo di detectare più agevolmente eventuali attivazioni del canale mutante R2Q a valori di potenziale intorno al valore soglia di apertura delle subunità KCNQ2 (circa -60 mV).

La Fig. 3 mostra delle tracce di registrazione di singolo canale ottenute da cellule trasfettate con il costrutto KCNQ2 *wild-type* (a sinistra) o incorporante la mutazione R2Q (a destra) mediante un protocollo detto “rampa”, in cui il potenziale di membrana passa in pochi secondi da -100mV a +40mV, rivelando il comportamento del canale in tale intervallo di potenziali test. È facile osservare come il canale *wild-type* mostra un potenziale soglia di attivazione (infatti, non sono rilevabili eventi di apertura a potenziali molto iperpolarizzanti) e la corrente viene condotta solo in direzione uscente. Al contrario, il canale incorporante la mutazione R2Q mostra chiaramente eventi di apertura a tutti i potenziali test con direzione della corrente dipendente solo dalla *driving force*, ossia dal gradiente elettrochimico risultante ad ogni potenziale applicato: infatti, è possibile notare corrente entrante per valori di potenziale più negativi del potenziale di reversione e correnti uscenti a valori di potenziale più positivi:



**Fig. 4.** Tracce elettrofisiologiche di singolo canale ottenute dal canale KCNQ2 wild-type (WT) e mutante (R2Q) utilizzando il protocollo “rampa”.

Per evidenziare tali differenze, abbiamo utilizzato un protocollo con potenziale fisso, scegliendo in particolare il potenziale di -80 mV (un potenziale “controllo” al quale il canale *wild-type* è chiuso) e di 0 mV (al quale il canale *wild-type* raggiunge lo steady-state di attivazione). Com’è possibile osservare dalla Fig. 5, al potenziale di 0 mV il canale *wild-type* mostra considerevoli eventi di apertura con corrente in direzione uscente, mentre a valori di potenziale di -80 mV non è possibile rilevare alcuna apertura, come atteso. Al contrario, il canale incorporante la mutazione R2Q mostra rilevanti eventi di apertura ad entrambi i valori di potenziale testati, con corrente in direzione entrante a valori di potenziale di -80 mV e uscente a valori di 0 mV:



**Fig. 5.** Tracce elettrofisiologiche di singolo canale ottenute con un protocollo a potenziale fisso a -80 o 0 mV per i canali KCNQ2 *wild-type* (WT) o mutante (R2Q). La scala di corrente indica 0.5 pA, mentre la scala di tempo indica 500 msec.

Per ognuno di questi potenziali sia per il canale *wild-type* che per il canale incorporante la mutazione R2Q abbiamo misurato due proprietà: la probabilità di apertura e la conduttanza di singolo canale.

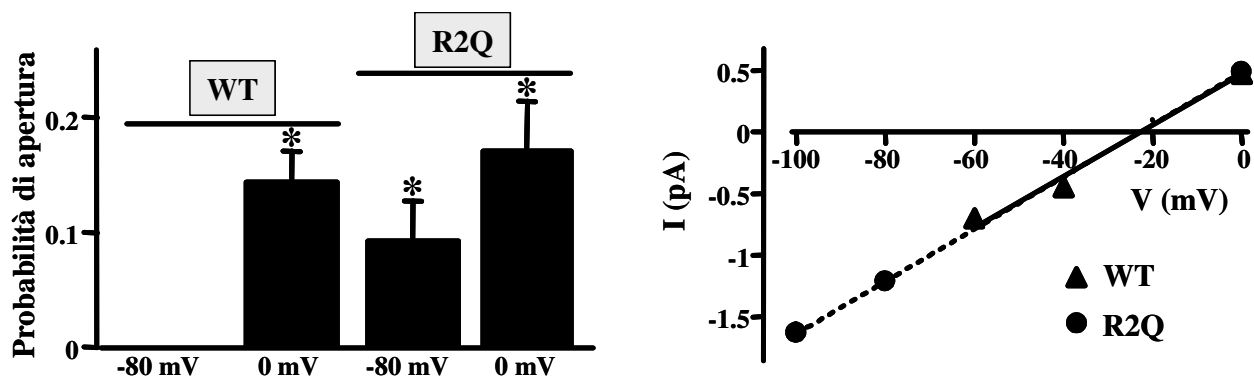
Il numero totale di canali presenti in ciascun patch è stato misurato sulla base di due considerazioni: (1) che tutti i canali in un patch si comportano nello stesso modo (ossia, che essi sono omogenei) e (2) che la  $P_o$  di un canale non dipende dallo stato di apertura o di chiusura degli altri canali presenti (ossia, che essi sono indipendenti). Sulla base di tali assunti, è stata considerata la presenza di un solo canale per ogni patch quando non venivano registrate sovrapposizioni di eventi di aperture per un tempo sufficientemente lungo, che dipende dalla  $P_o$  del canale considerato: nel caso delle subunità KCNQ2 che hanno una  $P_o$  massima di circa 0.2, è necessario un tempo di registrazione di almeno 1 min. Quando sono state osservate, invece, sovrapposizioni di tracce, il numero totale di canali presenti nel patch veniva calcolato come il numero massimo di aperture sovrapposte osservate durante l'intero tempo di registrazione.

Utilizzando il software di analisi Tac (Bruxon, Seattle, WA, USA), abbiamo quindi visivamente detectato per ogni traccia di corrente registrata con il protocollo a potenziale fisso gli eventi di apertura, nonché la loro ampiezza di corrente e la loro durata. A questo punto, il software misura il tempo totale che il canale si trova nello stato aperto rispetto all'intero tempo di registrazione (ossia la probabilità di apertura,  $P_o$ , per ogni potenziale testato), nonché il valore dell'inclinazione angolare della corda che meglio approssima la relazione tra l'ampiezza della corrente ed il potenziale applicato (ossia la proprietà di conduttanza del canale). Ovviamente, il valore di proprietà di apertura misurato viene diviso per il numero di canali presenti in ciascun patch.

Com'è possibile notare dalla Fig. 5, per il canale KCNQ2 *wild-type* la probabilità di apertura al valore di potenziale di -80 mV non è misurabile, mentre applicando un potenziale di 0 mV abbiamo misurato un valore di probabilità di apertura di  $0.14 \pm 0.02$  (n=3). Interessantemente, per il canale incorporante la

mutazione R2Q abbiamo misurato a 0 mV una probabilità di apertura di  $0.17 \pm 0.04$ , che risulta non diversa né da quella misurata per il canale KCNQ2 *wild-type* applicando lo stesso potenziale, né da quella misurata per il canale mutante applicando un potenziale di -80 mV ( $0.09 \pm 0.03$ ,  $n=3$ ,  $p>0.05$ ).

Nonostante tali profonde alterazioni delle proprietà di voltaggio-dipendenza del canale indotte dalla mutazione R2Q sulle proprietà di apertura delle subunità KCNQ2, i valori di ampiezza di corrente misurati per ogni potenziale considerato non risultano significativamente diversi per il canale KCNQ2 *wild-type* rispetto al canale incorporante la mutazione R2Q: infatti, abbiamo misurato una conduttanza di  $20.8 \pm 1.2$  pS per il canale *wild-type* e  $21.2 \pm 0.4$  pS per il canale R2Q ( $n=3$ ,  $p>0.05$ ).



**Fig. 5.** Misurazione della probabilità di apertura e di conduttanza di singolo canale per il canale KCNQ2 *wild-type* (WT) o mutante (R2Q).

I risultati ottenuti indicano che la presenza della mutazione R2Q nella subunità canale KCNQ2 non altera la selettività ionica del poro, né la probabilità massima di apertura del canale, ma elimina la voltaggio-dipendenza di apertura del canale nel range di potenziali considerati, confermando i dati ottenuti dalle registrazioni in *whole-cell* della stessa subunità canale.

Nel loro insieme, tali dati confermano il ruolo svolto dalle cariche positive presenti nel segmento S<sub>4</sub> della subunità KCNQ2 nel processo di attivazione del canale stesso ed, in particolare, conferiscono un ruolo centrale al secondo residuo di arginina nel determinare la voltaggio-dipendenza di tale processo. A questo punto, sarebbe interessante individuare, attraverso tecniche di mutagenesi sito-diretta accoppiata a studi funzionali, l'eventuale (o gli eventuali) residuo aminoacidico che nella subunità KCNQ2 *wild-type* interagisce con il residuo di arginina in studio, sia nella configurazione chiusa che aperta. Inoltre, le peculiarità biofisiche di tale subunità mutante potrebbero essere utili per ulteriori studi, finalizzati ad esempio a chiarire le modalità di interazione delle subunità KCNQ2 nell'assemblaggio omo- od eterotetramericco con la subunità KCNQ3.