



## ***Convulsionar: simulación de epilepsia neuronal debida a la mutación génica del canal de potasio-m***

María Eugenia Pérez Bonilla, Marleni Reyes Monreal,  
Jessica Quintero Pérez , Arturo Reyes Lazalde  
*Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (México)*



**Fecha de recepción:** 14/Ago/2018

**Fecha de aceptación:** 10/Sept/2018

**Resumen:** Se presenta el desarrollo del programa interactivo de cómputo CONVULSIONAR, que simula la función normal y patológica de los canales de  $K^+$  tipo-M en neuronas de hipocampo. El programa está formado por tres simuladores: 1) Señalizar-M, permite reproducir la función del canal en condiciones normales, debida a la interacción de la acetilcolina con el receptor metabotrópico, responsables de la modulación de la excitabilidad de la neurona, capaz de producir diversos patrones de potenciales de acción. 2) GenConvulsión-M, que genera ráfagas convulsivas de potenciales de acción, ocasionadas por la canalopatía-M, etiología de la convulsión neonatal familiar benigna (CNFB). 3) Registrar-M, que reproduce los experimentos electrofisiológicos con la técnica de fijación de voltaje, donde se simula la corriente saliente lenta que no inactiva. Cuenta con un leccionario que introduce al usuario al tema. El programa fue desarrollado en Visual Basic® versión 6.0 para ser ejecutado en ambiente Windows®, desde XP a Windows 10. Se utilizó el modelo matemático de Hodgking y Huxley (1952), las ecuaciones se resolvieron computacional y simultáneamente por métodos numéricos. El uso del programa facilita la comprensión del mecanismo de regulación de la excitabilidad de la neurona por el canal-M, la funcionalidad del canal metabotrópico y la patogénesis de la CNFB, desencadenada por la

mutación del gen KCNQ. Los modelos biofísicos y matemáticos son de invaluable utilidad para el entendimiento de los mecanismos morfofisiopatogénicos de la canalopatía.

**Palabras clave:** Simuladores, CNFB, Canal de potasio-M, Corriente-M.

**Abstract:** **Convulsionar: simulation of neuronal epilepsy due to m-type potassium channel mutation**

The development of interactive computer program CONVULSIONAR is presented, which simulates the normal and pathological function of the M-type K<sup>+</sup> channels in hippocampal neurons. The program consists of three simulators: 1) Señalizar-M, allows to reproduce the function of M-channel under normal conditions, due to the interaction of acetylcholine with the metabotropic receptor, responsible to modulate neuronal excitability, capable of producing different patterns of action potentials. 2) GenConvulsión-M, which generates convulsive bursts of action potentials, caused by channelopathy-M, etiology of benign familial neonatal convulsion (BFNS). 3) Registrar-M, which reproduces the electrophysiological experiments with the voltage fixation technique, where the slow outgoing current that does not inactivate is simulated. It has a lectionary that introduces the user to the topic. The program was developed in Visual Basic® version 6.0 to be executed in Windows® environment, from XP to Windows 10. The mathematical model of Hodgking and Huxley (1952) was used; the equations were solved computationally and simultaneously by numerical methods. The use of the program facilitates the understanding the mechanism of regulation of neuron excitability by the M-channel, the functionality of the metabotropic channel and the pathogenesis of CNFB, triggered by the KCNQ gene mutation. The biophysical and mathematical models are of invaluable utility for the understanding of the morphophysipathogenic mechanisms of the channelopathy.

**Keywords:** Simulators, BFNS, Potassium channel-M, Current-M.

## **Introducción**

En el programa curricular de la materia de biofísica, de la carrera de biología, se incluye el tema de los canales iónicos, que comprenden los canales de Na<sup>+</sup> y de K<sup>+</sup> dependientes de voltaje, estudiados en la preparación clásica del axón gigante de calamar por Hodgkin y Huxley (1952). Para la enseñanza del tema

se cuenta con varios simuladores que reproducen sus características electrofisiológicas; por ejemplo el programa Nerve (Bezanilla, <http://nerve.bsd.uchicago.edu/>). En la Facultad de Biología se tienen los programas Fijar-V (Reyes-Lazalde et al., 2016) y Potenciar4 (Reyes-Lazalde, 2016). Con respecto a los canales metabotrópicos, se carecía del apoyo didáctico computacional y de ejemplos particulares que faciliten la relación y asociación de una alteración molecular con un síndrome epiléptico. En este trabajo, se desarrolló e implementó un programa para la enseñanza-aprendizaje de la modulación de la excitabilidad neuronal por el canal de  $K^+$  tipo-M, en condiciones normales y patológicas que conducen a la CNFB. Se seleccionó este canal debido a que presenta varias características que lo hacen muy importante para el funcionamiento del cerebro: (1) es un canal que regula la excitabilidad de la neurona (Maljevic et al., 2008; Rogawski, 2000), (2) está implicado en la generación de diferentes patrones de disparo de potenciales de acción (PA) (Delmas y Brown, 2005; Yue y Yaari, 2004), (3) está abierto a potenciales subumbrales, (4) suprime las ráfagas de PA, y esto evita posibles epilepsias (Brown y Adams, 1980), (5) se conocen los genes implicados en la formación del canal y sus mutaciones más frecuentes (Leppert et al., 1989) (6) algunas mutaciones en el canal producen el síndrome epiléptico llamado: convulsión neonatal familiar benigna (CNFB) (Inn-Chi et al., 2018; Oyrer et al., 2017; Lerche et al., 2001), (7) el canal se distribuye en áreas críticas del cerebro, donde se originan focos convulsivos: hipocampo, neocorteza, tálamo y estriado (Klinger et al., 2011, Shen et al., 2005), (8) en la neurona, se localizan en el segmento inicial del axón y/o en los nodos de Ranvier (Devaux et al., 2004), (9) su receptor se localiza distante del canal (Haga, 2013), (10) el receptor está asociado a una proteína G (Suh y Hille, 2007), (11) la apertura del canal se debe a la fosforilación con PI(4,5)P2 (Zaydman y Cui, 2014; Telezhkin, et al., 2012), (12) el cierre del canal se debe a una disminución de la

concentración de PI(4,5)P<sub>2</sub> debido a una fosfolipasa C, generada por la cascada de señalización (Zhang et al., 2003), (13) el ligando del receptor es la acetilcolina y su agonista es la muscarina, razón por la que se le llama canal de tipo muscarínico (Brown y Adams, 1980).

En este trabajo se pone especial atención en la relación del canal tipo-M y la epilepsia (CNFB), debida a mutaciones de los genes que codifican para el canal. La CNFB es una enfermedad epiléptica rara, que se caracteriza por convulsiones generalizadas, no provocadas, o por convulsiones tónico-clónicas. Estas convulsiones se inician alrededor del tercer día de vida y desaparecen espontáneamente después de varias semanas o meses. En la mayoría de los casos el desarrollo es normal y solamente de 10 a 15 % de los afectados presentan episodios epilépticos tardíos (Ronen et al., 1993). Se demostró que los genes KCNQ2 y KCNQ3 codifican para los canales de K<sup>+</sup> dependiente de voltaje y del tiempo (Kv7.2 y Kv7.3), los llamados canales tipo-M y que algunas de sus mutaciones provocan CNFB (Singh et al., 1998; Charlier et al., 1998). Leppert et al. (1989) mapearon el primer gen de CNFB en el brazo largo del cromosoma 20q13.2, para KCNQ2; un segundo locus fue identificado en el cromosoma 8q, para KCNQ3. En el canal KCNQ2 se han reportado al menos 38 mutaciones (Oyler et al., 2017; Inn-Chi et al., 2018) y dos para KCNQ3 (Lerche et al., 2001). Estas mutaciones disminuyen drásticamente la corriente-M, la neurona se hace más excitable y produce trenes de PA causantes de la epilepsia.

### **Objetivo principal de enseñanza**

Ejemplificar concretamente las alteraciones secuenciales desde la mutación génica a la manifestación clínica del síndrome epiléptico; enfocando la

importancia funcional de los canales de potasio tipo-M en el funcionamiento cerebral.

### **Objetivos particulares de aprendizaje**

Comprender la importancia de la modulación de la excitabilidad neuronal, la vía de señalización ligando-receptor responsable del cierre del canal, la dependencia de voltaje del canal metabotrópico, los cambios conformacionales del canal de  $K^+$  tipo-M que conducen a las crisis convulsivas características de la CNFB.

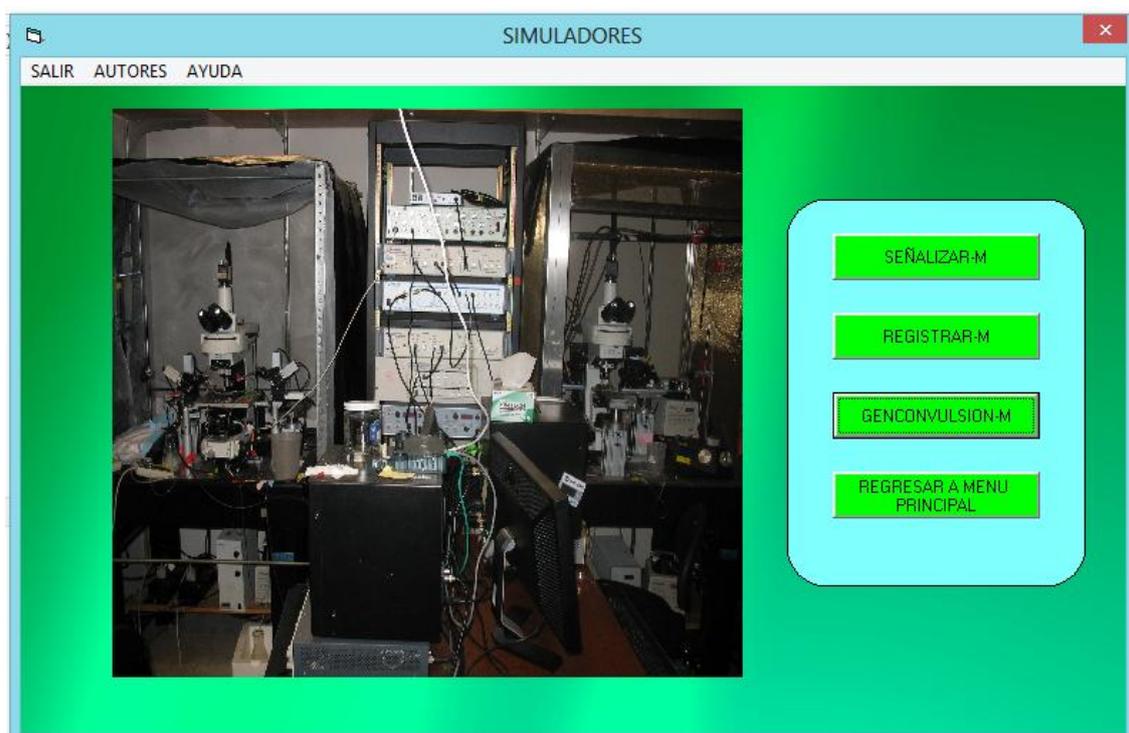
### **Metodología**

Se diseñó y desarrolló un programa de cómputo interactivo para el estudio de la función del canal de  $K^+$  tipo-M en neuronas de hipocampo. El programa consta de dos módulos: (1) Simuladores y (2) Leccionario. El módulo de simuladores cuenta con tres simuladores: (A) Señalizar-M, reproduce la función del canal tipo-M en condiciones normales. Se diseñó para que el usuario tenga acceso a dos situaciones de manera secuencial: Condiciones normales con una interfaz para simular el efecto de la corriente-M en el tren de potenciales de acción y con otra interfaz donde se activa el receptor por la acetilcolina y muestra su acción. (B) GenConvulsion-M, se planteó una interfaz para presentar la electrofisiología del canal-M cuando está mutado y produce CNFB. El grado de afectación podrá medirse cambiando la conductancia de la corriente-M. (C) Registrar-M, se programó una interfaz para realizar experimentos con la técnica de fijación de voltaje. El leccionario está formado por varias pantallas que introducen al usuario en el tema.

El modelo matemático utilizado para los simuladores corresponde al propuesto por Hodgkin y Huxley (1952), al que se le agregó un modelo similar para la corriente-M (Yamada et al., 1998). Las ecuaciones diferenciales fueron resueltas de manera simultánea por el método de Euler.

## **Resultados**

El software desarrollado presenta dos módulos cada uno con un menú principal: (1) Módulo de simuladores para simular experimentos en fijación de corriente y de voltaje (Figura 1). Con el botón <Señalizar-M> se ingresa al simulador que permite reproducir el efecto de la acetilcolina en el receptor muscarínico, con el botón <Registrar-M> se ingresa al simulador que reproduce los experimentos en fijación de voltaje y con el botón <Genconvulsión-M> se ingresa al simulador para generar las ráfagas de PA que ocasionan la CNFB y (2) Módulo de lecciones, donde se accede a temas relacionados con la corriente tipo-M y con la CNFB (Figura 2). Cada botón lleva a una pantalla que expone brevemente el tema correspondiente y desde ahí se ingresan a otras pantallas que complementan el tema. En todo momento se puede regresar al menú principal o salir del programa.



**Figura 1. Menú del módulo de simuladores.** Del lado izquierdo se muestra un “setup” de registro. Esta figura se aprovecha para explicar al alumno que los experimentos virtuales de los simuladores corresponden a registros intracelulares de neuronas de hipocampo, para esto es necesario obtener rebanadas de cerebro y equipos especializados de registro y de estimulación. Del lado derecho, un recuadro con el menú: <Señalizar-M>, <Genconvulsion-M> y <Registrar-M>.



**Figura 2. Menú del módulo de lecciones.** Se muestran los botones para acceder a las lecciones: <Síndromes epilépticos>, <CNFB>, <Cómo se produce la CNFB>, <Canalopatías epilépticas>, <Canales de  $K^+$ >, <Canales de  $K^+$  tipo-M>, <Mutaciones de los canales KCNQ2 y KCNQ3> y <Corriente tipo-M>.

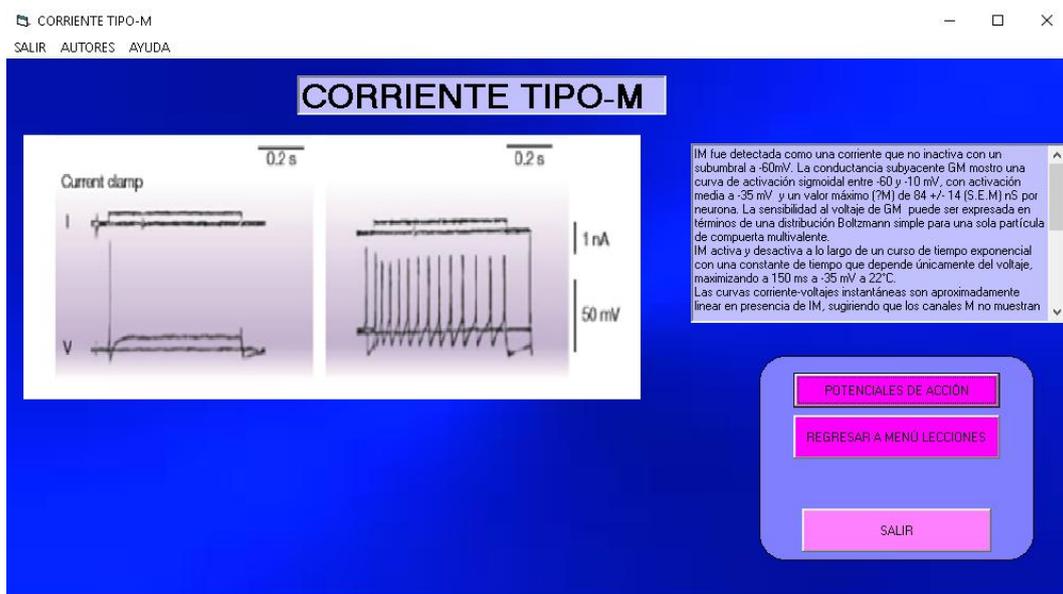
El usuario puede ingresar a cada lección y no existe una navegación predeterminada. Se abordan temas que van desde la estructura molecular del canal, del receptor y de sus mutaciones, hasta la enfermedad. Se presentan las características de la corriente tipo-M y los trazos de PA en condiciones fisiológicas.

### **Ejemplo de lección <Corriente tipo-M>**

#### **Fisiología del canal de $K^+$ tipo-M en condiciones fisiológicas**

Los canales de  $K^+$  tipo-M se localizan en una parte de la membrana y el receptor en otra, se asocian por una proteína G; a este tipo de canal se le llama

metabotrópico. El canal se encuentra normalmente abierto debido a que está unido a PI(4,5)P2 (fosforilando el canal). Al receptor se le une acetilcolina (o un agonista como la muscarina) y mediante una proteína G y la acción de segundos mensajeros, el canal se cierra debido a una disminución de PI(4,5)P2 y se producen trenes de PA (Figura 3). La modulación de la excitabilidad de la neurona ocasiona que en un momento deje de producir PA y en otro, cuando la acetilcolina se une al receptor, se producen PA. De manera que en el tiempo se esperan periodos de “silencio” y de “respuesta” ocasionando patrones de PA; una especie de lenguaje neuronal que aún no se comprende, pero que seguramente tiene un significado fundamental en la función cerebral.



**Figura 3. Lección de experimentos en fijación de corriente.** La interfaz muestra los PA producidos por una inyección de corriente. El trazo del lado izquierdo, cuando el canal tipo-M está abierto, impide que se produzcan nuevamente PA. Molecularmente, implica que el receptor muscarínico está libre. El trazo del lado derecho, muestra un tren de PA debido a la acción de la acetilcolina con el receptor, se cierra el canal tipo-M y se produce una ráfaga de PA. En el recuadro superior derecho se muestra una breve descripción del proceso.

## Ejemplo de simulación en condiciones fisiológicas. Efecto de la corriente tipo-M en la neurona

Cuando el receptor muscarínico se encuentra sin ligando, el canal tipo-M se encuentra abierto. En estas condiciones se produce una corriente de  $K^+$  saliente que hiperpolariza a la neurona y la regresa al potencial de reposo. Cada vez que el potencial de membrana (PM) se acerca al umbral de disparo se abre el canal debido a que es dependiente de voltaje, es sensible a estos valores de voltaje (valores por debajo del umbral de disparo). En consecuencia, se producen solamente algunos potenciales de acción, entonces el canal censa los potenciales subumbrales y ya no permite que se produzcan más, porque la corriente-M repolariza. La figura 4, muestra la interfaz de la simulación de un experimento en fijación de corriente. Se aplica un pulso de 200 ms de duración y una amplitud de 8 nA, en el osciloscopio inferior izquierdo, se observa el patrón de disparo.

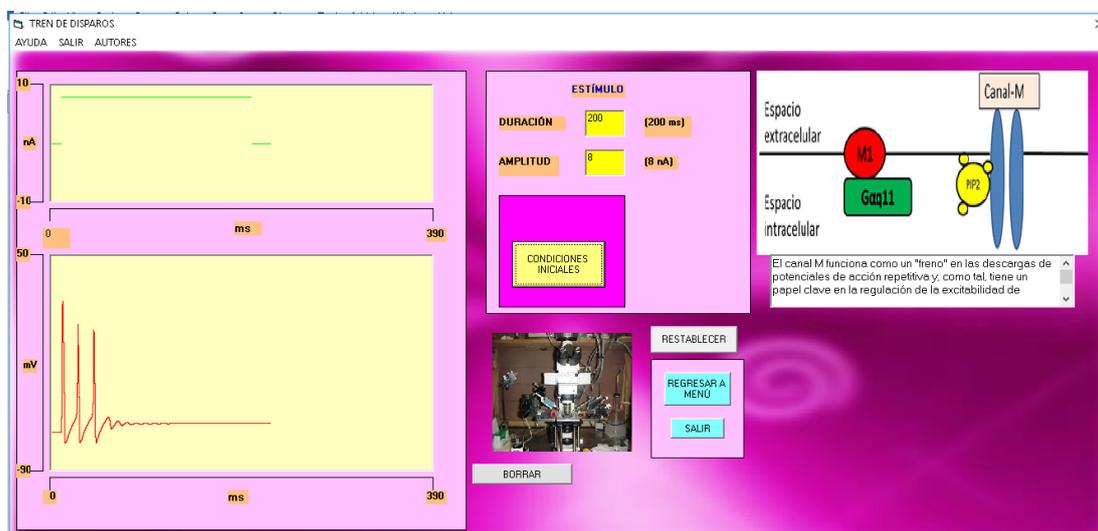


Figura 4. Interfaz que muestra un experimento en condiciones normales (fisiológicas). Como se observa en el panel superior derecho, el receptor-M está libre, el canal tipo-M está abierto, la excitabilidad de la neurona está disminuida y los PA ya no se

producen. El registro electrofisiológico, muestra como es “frenado” el tren de PA debido a la corriente saliente de  $K^+$ .

## Ejemplo de generación de patrones de disparo

En condiciones fisiológicas, la acetilcolina se une al receptor muscarínico. Cada vez que se realiza esta unión se inicia la cascada de señalización vía proteína G. El resultado es el cierre del canal tipo-M y esto hace que se presente un tren de PA. La interacción intermitente de la acetilcolina con el receptor genera una gran diversidad de patrones de disparo (Figura 5). Al cerrarse el canal la corriente de  $K^+$  cesa y el potencial de membrana alcanza el umbral de disparo, en consecuencia se producen ráfagas de PA. Cuando se libera el receptor, entonces el canal nuevamente se abre y se produce la corriente saliente de  $K^+$  que regresa el PM al potencial de reposo, la neurona se hace silente. Si nuevamente se une la acetilcolina al receptor se inician de nuevo los PA.

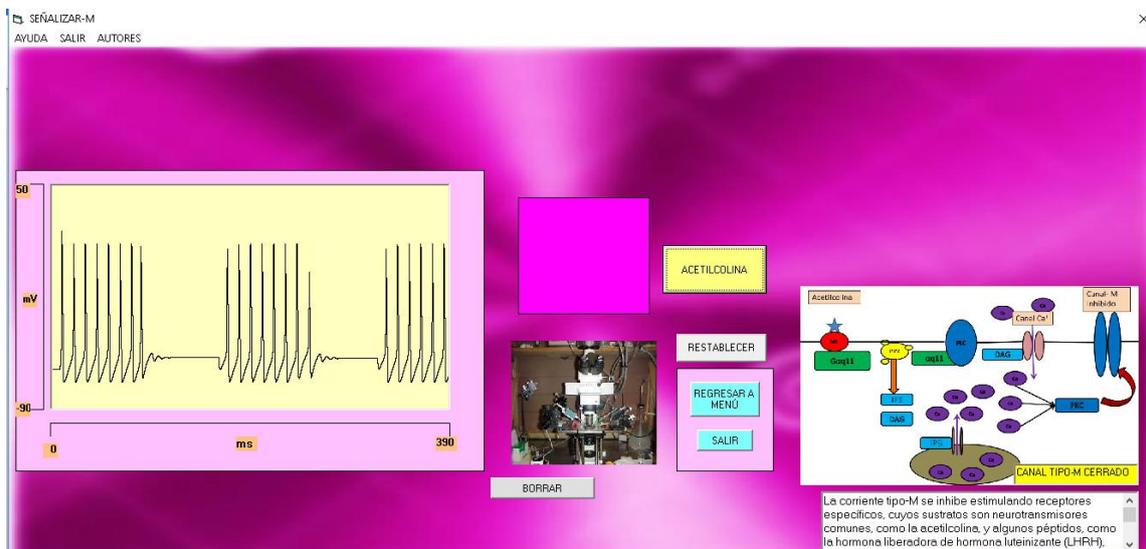
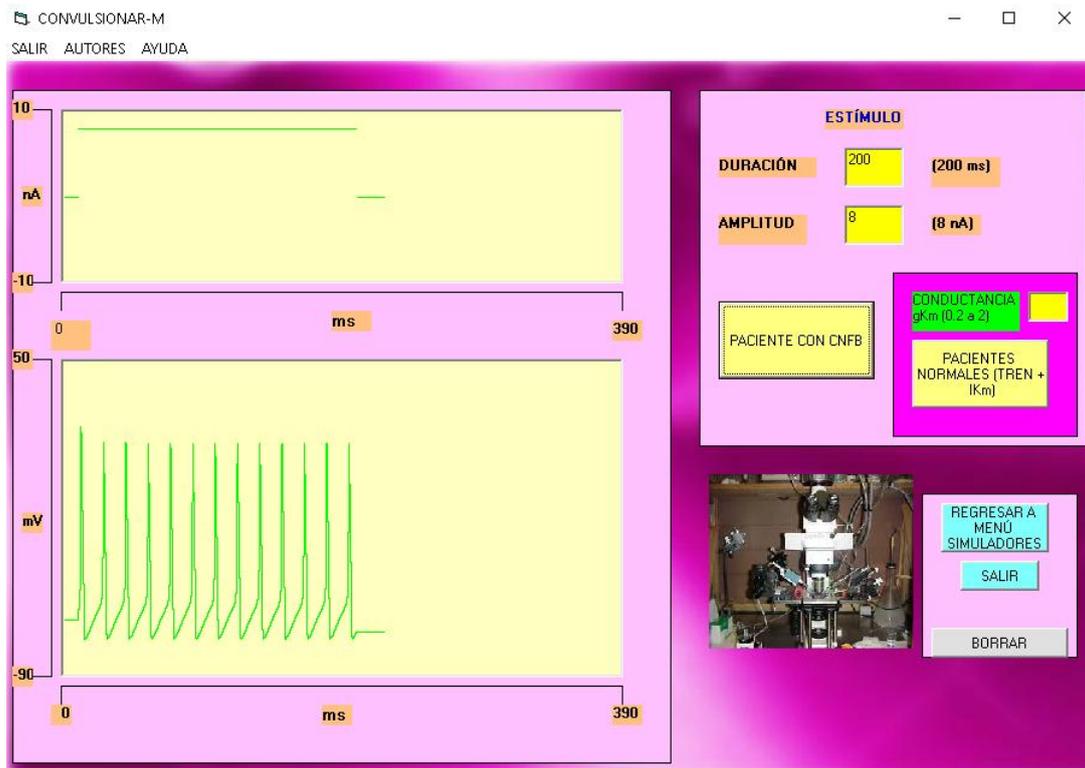


Figura 5. Interfaz de la interacción de acetilcolina con el receptor. En el osciloscopio de registro se muestra el patrón de disparo, resultado de la acción intermitente de la

acetilcolina. El neurotransmisor se une al receptor y se activa la cascada de segundos mensajeros, el resultado es el cierre de los canales tipo-M y se produce un tren de PA. En consecuencia, cada tren es debido a la acción de la acetilcolina que cierra el canal. Los espacios silentes se deben a la acción de la corriente-M cuando el canal está abierto y el receptor queda libre.

### **Ejemplo de simulación de convulsiones**

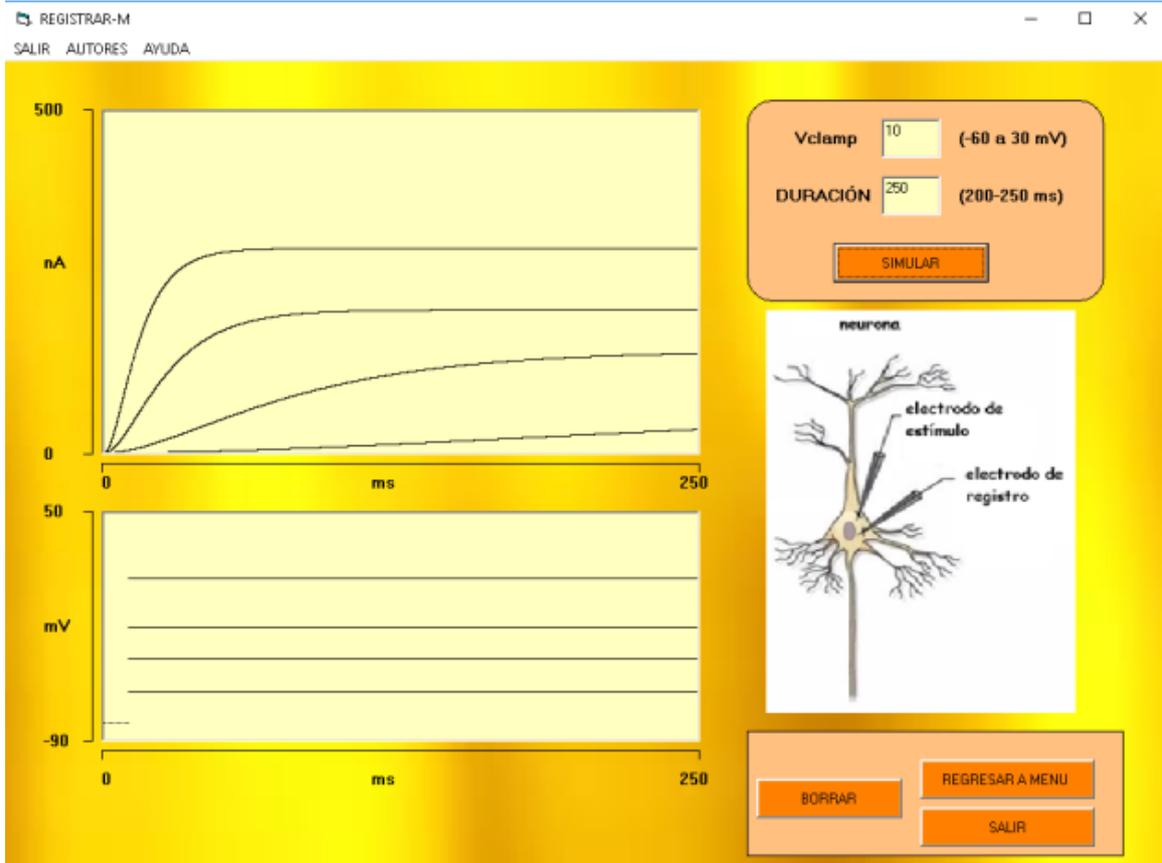
Como se mencionó en la introducción, una mutación en el canal tipo-M modifica la conformación molecular del canal y evita que se abra correctamente. Esta condición produce una disminución de la corriente-M hasta de un 90 al 100%, la neurona se hace más excitable y se produce una ráfaga de PA. La sincronización de varias neuronas en estas condiciones produce la convulsión neonatal familiar benigna. La figura 6, muestra la interfaz del simulador que está dividida en dos partes: una izquierda que presenta los osciloscopios para el registro de potenciales de acción y pulso del estímulo. Del lado derecho, se encuentra un recuadro con casillas para ingresar el pulso de estímulo. Debajo, un botón <Paciente con CNFB> y a la derecha de este, se muestra un recuadro que permite modificar la conductancia del canal tipo-M.



**Figura 6. Simulador de ráfagas de PA que origina CNFB.** La interfaz muestra los potenciales de acción producidos durante un estímulo en condiciones de mutación en el canal. La consecuencia clínica es la CNFB.

### Ejemplo de experimento en fijación de voltaje.

Los registros intracelulares con la técnica de fijación de voltaje muestran que la corriente de  $K^+$  de tipo-M es saliente, lenta y no inactiva (Figura 7). El canal cuenta con un sensor de voltaje localizado en el cuarto segmento transmembranal y censa el voltaje a niveles subumbrales. De manera que cuando el potencial de membrana alcanza este voltaje, el canal se abre, dejando salir iones  $K^+$ ; la pérdida de cargas positivas hace que el potencial de membrana se repolarice, alejándose del umbral de disparo y por lo tanto disminuyendo la excitabilidad de la neurona.



**Figura 7. Interfaz del experimento en fijación de voltaje.** Del lado izquierdo, se muestran dos osciloscopios, el superior muestra los registros de corriente y el inferior el pulso de estímulo. Del lado derecho, se muestra un recuadro para el ingreso de la amplitud y duración del estímulo. El cualquier momento el usuario puede regresar al menú principal o salir del programa.

## Discusión

Los simuladores se desarrollaron con la finalidad de mostrar la actividad electrofisiológica del canal de  $K^+$  tipo-M, que está asociado a la modulación de la excitabilidad y el funcionamiento de la corriente-M en condiciones normales y patológicas. La actividad de este canal explica en buena medida la complejidad funcional cerebral. La asociación de mutaciones en la estructura de un canal con un tipo de epilepsia resulta novedosa. Con los simuladores el

alumno podrá realizar una serie de experimentos virtuales que le permitirán aprender que existen otro tipo de canales, los llamados canales metabotrópicos, que en este caso también son dependientes de voltaje. Con el leccionario se repasa el mecanismo de interacción entre el receptor y el canal que está actualmente bien estudiado (Kosenco et al., 2012; Suh y Hille, 2008; Hoshi, 2003). Con el asesoramiento docente y el uso del programa se podrán asociar los aspectos teóricos y experimentales que contribuyen a una mejor comprensión biofísica y su utilidad biomédica, se promueve el interés por el funcionamiento cerebral y las enfermedades neurológicas, como el caso de CNFB.

## **Conclusiones**

El programa computacional CONVULSIONAR es una herramienta didáctica de apoyo que permite reproducir los experimentos electrofisiológicos del canal de  $K^+$  tipo-M y estudiar sus implicaciones en la regulación de la excitabilidad neuronal y en la generación de CNFB. Este tipo de experimentos son imposibles de realizar, al menos en el nivel de licenciatura, debido a los altos costos que implica la compra de animales de laboratorio, los equipos electrónicos especializados y los reactivos. Los simuladores son una alternativa para que todos los alumnos tengan oportunidad de producir, observar e interpretar resultados experimentales, condición que no se puede alcanzar, ni apreciar, con la simple lectura en libros de texto y artículos científicos, debido entre otras cosas, a que los registros que se presentan son estáticos. Para un mayor impacto en el aprendizaje con los simuladores, desarrollados aquí, se recomienda una visita guiada a un laboratorio de investigación electrofisiológica. Cabe mencionar que este programa de cómputo no sustituye al profesor y es necesaria la conjunción de clases teóricas que

generen conocimientos previos para la correcta interpretación de los resultados y el uso de los simuladores con una guía especializada.

## **Referencias**

Brown, D.A., Adams, P.R. (1980). “Muscarinic suppression of novel voltage-sensitive K<sup>+</sup> current in a vertebrate neuron”. *Nature* 283:673-675.

Charlier, C., Singh, N.A., Ryan, S.G., Lewis, T.B., Reus, B.E., Leach, R.J., Leppert, M. (1998). “A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family”. *Nature Genetics* 18:53-55.

Cooper, E.C., Aldape, K.D., Abosch, A., Barbaro, N.M., Berger, M.S., Peacock, W.S., Jan, Y.N., Jan, L.Y. (2000). “Colocalization and coassembly of two human brain M-type potassium channel subunits that are mutated in epilepsy”. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97(9):4914–4919.

Delmas, P., Brown, D.A. (2005). “Pathways modulating neural KCNQ/M Kv7 potassium channels”. *Nature Reviews Neuroscience* 6(11):850-862.

Devaux, J.J., Kleopa, K.A., Cooper, E.C., Scherer, S.S. (2004). “KCNQ2 is a nodal K<sup>+</sup> channel”. *J. Neurosci.* 24:1236-1244.

Haga, T. (2013). “Molecular properties of muscarinic acetylcholine receptors”. *Proc. Jpn. Acad. Ser.* 89:226-256.

Hodgkin, A.L, Huxley, A.F. (1952). “A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve”. *J. Physiol.* 117(4):500-544.

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

Inn-Chi, L., Jiann-Jou, Y., Shuan-Yow, L. (2018). “KCNQ2-associated epilepsy: A review of variable phenotypes and neurodevelopmental outcomes”. *Neuropsychiatry* 8(1):318-323.

Klinger, F., Gould, G., Boehm, S., Shapiro, M.S. (2011). “Distribution of M-channel subunits KCNQ2 and KCNQ3 in rat hippocampus”. *NeuroImage* 58:761–769.

Kosenko, A., Kang, S., Smith, I.M., Greene, D.L., Langeber, L.K., Scott, J.D., Hoshi, N. (2012). “Coordinated signal integration at the M-type potassium channel upon muscarinic stimulation”. *The EMBO Journal* 31(14):3147–3156.

Leppert, M., Anderson, V.E., Quattlebaum, T., Stauffer, D., O’conell, P., Nakamura, Y., Lalouel, J.M., White, R. (1989). “Benign familial neonatal convulsions linked to genetic markers on chromosome 20”. *Nature* 337:647-48.

Lerche, H., Jurkat-Rott, K., Lehmann-Horn, F. (2001). “Ion channels and epilepsy”. *American Journal of Medical Genetics* 106(2):146-159.

Maljevic, S., Wuttke, T.V., Lerche, H. (2008). “Nervous system KV7 disorders: breakdown of a subthreshold brake”. *J. Physiol.* 586:1791-1801.

Oyler, J., Maljevic, S., Scheffer, I.E., Berkovic, S.F., Petrou, S., Reid, C.A. (2017). “Ion channels in genetic epilepsy: from genes and mechanisms to disease-targeted therapies”. *Pharmacol. Rev.* 70:142–173

Reyes-Lazalde, A., Reyes-Monreal, M., Pérez-Bonilla, M.E. (2016). “Desarrollo de un simulador de los experimentos clásicos y actualizados de fijación de voltaje de Hodgkin y Huxley”. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica* 37(2):135-148.

Reyes-Lazalde, A., Reyes-Monreal, M., Pérez-Bonilla, M.E. (2016). “Diseño de software para prácticas de electrofisiología con un enfoque cognitivo-constructivista”, *Revista Electrónica de Didáctica en Educación Superior* 11:1-17.

Rogawski M.A. (2000). “KCNQ2/KCNQ3 K<sup>+</sup> channels and the molecular pathogenesis of epilepsy: implications for therapy”. *Trends. Neurosci.* 23:393–398.

Ronen, G. M., Rosales, T. O., Connolly, M., Anderson, V. E., Leppert, M. (1993). “Seizure characteristics in chromosome 20 benign familial neonatal convulsions”. *Neurology* 43:1355-60.

Shen, W., Hamilton, S.E., Nathanson, N.M., Surmeier, D.J. (2005). “Cholinergic suppression of KCNQ channel currents enhances excitability of striatal medium spiny neurons”. *J. Neurosci.* 25:7449–7458.

Schroeder, B.C., Kubisch, C., Stein, V., Jentsch, T.J. (1998). “Moderate loss of function of cyclic-AMP-modulated KCNQ2/KCNQ3 K<sup>+</sup> channels causes epilepsy”. *Nature* 396:687-90.

Shyng, S.L., Valiyaveetil, F.I., Whorton, M. (2018). *Potassium Channels: Methods and Protocols*. Humana Press. Portland, OR, USA.

Singh, N.A., Charlier, C., Stauffer, D., Dupont, B.R., Leach, R.J., Melis, R. (1998). “A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns”. *Nature Genet.* 18:25-29.

Suh, B.C., Hille, B. (2008). “PIP<sub>2</sub> is necessary cofactor for ion channel function: how and why?”. *Annu. Rev. Biophys.* 37:175–195.

Suh, B.C., Hille, B. (2007). “Regulation of KCNQ channels by manipulation of phosphoinositides”. *J. Physiol.* 582(3):911–916.

Telezhkin, V., Reilly, J.M., Thomas, A.M., Tinker, A., Brown, D.A. (2012). “Structural Requirements of Membrane Phospholipids for M-type Potassium Channel Activation and Binding”. *J. Biol. Chem.* 287(13):10001–10012.

Yamada, M.W., Koch, C., Adams, R.P. (1998). *Multiple Channels and Calcium Dynamics*. In: Koch C. and Segev I. *Methods in Neuronal Modeling*. MIT Press, London, England, pp.168-169.

Yue, C., Yaari, Y. (2004). “KCNQ/M channels control spike afterdepolarization and burst generation in hippocampal neurons”, *J. Neurosc.* 24(19):4614-4624.

Zaydman A.M., Cui, J. (2014). “PIP2 regulation of KCNQ channels: biophysical and molecular mechanisms for lipid modulation of voltage-dependent gating”. *Frontiers in Physiology* 5:1-11.

Zhang, H., Craciun, L.C., Mirshahi, T., Rohács, T., Lopes, M.B.C., Jin, T., Logothetis, E.D. (2003). “PIP2 Activates KCNQ channels, and its hydrolysis underlies receptor-mediated inhibition of M currents”, *Neuron* 37:963-975.