

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Farmacología



**TESIS DOCTORAL**

Determinantes moleculares de la interacción entre los canales  
cardiacos humanos Nav1.5 y Kir2.x

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Marcos Matamoros Campos**

Directores

Eva Delpón Mosquera  
Juan Tamargo Menéndez,  
Ricardo Caballero Collado

**Madrid, 2017**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**



**DETERMINANTES MOLECULARES DE LA  
INTERACCIÓN ENTRE LOS CANALES  
CARDIACOS HUMANOS Nav1.5 Y Kir2.x**

**TESIS DOCTORAL DE**

**D. Marcos Matamoros Campos**

**DIRECTORES**

**Dra. Eva Delpón Mosquera**

**Dr. Juan Tamargo Menéndez**

**Dr. Ricardo Caballero Collado**

**Madrid, 2017**







**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**



**DETERMINANTES MOLECULARES DE LA  
INTERACCIÓN ENTRE LOS CANALES  
CARDIACOS HUMANOS Nav1.5 Y Kir2.x**

**TESIS DOCTORAL DE**

**D. Marcos Matamoros Campos**

**DIRECTORES**

**Dra. Eva Delpón Mosquera**

**Dr. Juan Tamargo Menéndez**

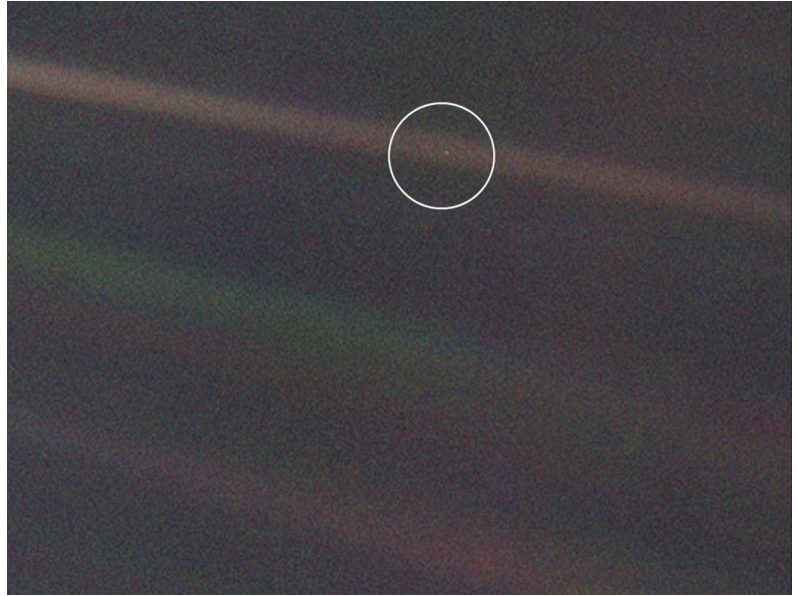
**Dr. Ricardo Caballero Collado**

**Madrid, 2017**



*A mis padres*





*“We succeeded in taking that picture, and, if you look at it, you see a dot. That's here. That's home. That's us. On it, everyone you ever heard of, every human being who ever lived, lived out their lives. The aggregate of all our joys and sufferings, thousands of confident religions, ideologies and economic doctrines, every hunter and forager, every hero and coward, every creator and destroyer of civilizations, every king and peasant, every young couple in love, every hopeful child, every mother and father, every inventor and explorer, every teacher of morals, every corrupt politician, every superstar, every supreme leader, every saint and sinner in the history of our species, lived there – on a mote of dust, suspended in a sunbeam.*

*The Earth is a very small stage in a vast cosmic arena. Think of the rivers of blood spilled by all those generals and emperors so that in glory and in triumph they could become the momentary masters of a fraction of a dot. Think of the endless cruelties visited by the inhabitants of one corner of the dot on scarcely distinguishable inhabitants of some other corner of the dot. How frequent their misunderstandings, how eager they are to kill one another, how fervent their hatreds. Our posturings, our imagined self-importance, the delusion that we have some privileged position in the universe, are challenged by this point of pale light.*

*[...] To my mind, there is perhaps no better demonstration of the folly of human conceits than this distant image of our tiny world. To me, it underscores our responsibility to deal more kindly and compassionately with one another and to preserve and cherish that pale blue dot, the only home we've ever known.”*

Carl Sagan

Discurso en la Universidad de Cornell mientras mostraba una imagen de la Tierra tomada por la sonda espacial Voyager I desde una distancia de 6000 millones de kilómetros

13 de Octubre de 1994



# AGRADECIMIENTOS

*“Si uno no espera lo inesperado, no lo encontrará, que es difícil e inaccesible.”*

Heráclito de Éfeso (*Fragmento 18*, siglos V/VI a.C.)

*“Cuando eliminas lo imposible, lo que queda, aunque improbable, debe ser la verdad.”*

Sr. Spock citando a Sir Arthur Conan Doyle  
(*Star Trek VI: Aquel país desconocido*, 1991)

Empecemos desde el principio. Una mañana hace ya casi cinco años me encontraba, después de acabar la carrera de Bioquímica y haber hecho un máster en Biofísica, en la situación que muchos jóvenes universitarios se encontraban y se encuentran hoy en día, con ganas de intentar aventurarse en el mundo de la investigación, pero sin “patrocinador”. Para afrontar la nada despreciable tarea de llevar a cabo una tesis necesitaba de un “*sponsor*” que me proporcionara sustento durante los años venideros. Así que mi trabajo durante esos días, semanas e incluso meses fue la de buscar sin descanso algún grupo investigador donde pudiera comenzar una nueva vida después de la carrera y el máster. Tras varias reuniones más o menos esperanzadoras me encontré en la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid realizando una entrevista en el Departamento de Farmacología. Ellos tenían una beca y yo les “vendí la moto” para que me la dieran. La verdad que candidatos no les faltaron, pero desde el primer día hubo muy buenas sensaciones entre nosotros y al final me acabaron ofreciendo la beca. Así en Febrero de 2012 es como comenzó esta Tesis Doctoral.

Por el apoyo que siempre me han ofrecido, por todos los conocimientos que he aprendido de ellos, por todo lo que me han enseñado y por la oportunidad que me dieron desde el principio, es necesario dar las gracias a mis directores de Tesis, los Profesores Juan Tamargo, Eva Delpón y Ricardo Caballero. Les deseo lo mejor, pues sin ellos, sin sus ideas y fabulosos proyectos, esta Tesis no hubiese sido posible.

## *Agradecimientos*

*“Estos son malos tiempos. Los hijos han dejado de obedecer a sus padres y todo el mundo escribe libros.”*

(Marco Titulio Cicerón, siglo I a.C.)

Por supuesto otra parte fundamental en la que me he sustentado, no sólo durante esta Tesis si no durante toda la vida, es mi familia. Todavía recuerdo los primeros documentales científicos (Cosmos de Carl Sagan, por ejemplo) y películas de ciencia ficción que empecé a ver de bien pequeño por “culpa” de mi padre, para que pudiera preparar mejor sus clases de biología en el colegio, y que probablemente influyeron a la hora de dedicarme a la investigación. Quisiera agradecer sobre todo a mis padres que son las personas que siempre han estado a mi lado (aunque pocas veces les haya hecho caso), que siempre me apoyaron cuando me quise dedicar a la investigación, que me han “aguantado” a lo largo de los años, pero en concreto estos últimos meses escribiendo la Tesis, por todo ello y por mucho más les estaré eternamente agradecido.

También me gustaría agradecer a mi hermana y a mi tía por estar ahí siempre que lo he necesitado, aunque apenas nos veamos, se que puedo confiar en vosotras, un abrazo muy grande.

*“Great news, everyone! You'll be delivering a package to Chapek 9, a world where humans are killed on sight.”*

Profesor H. Farnsworth

(*“Fear of a Bot Planet”*, Futurama 1999)

Una de las frases preferidas del profesor Farnsworth, con las que siempre empezaba alguna aventura suicida de Fry, Bender y compañía, bien podría definir (en el mejor de los sentidos) cuando los jefes (y directores de esta Tesis) llegaban con alguna nueva idea o proyecto en mente y querían ponerlo en marcha con nuestra ayuda, la ayuda de la gente que ha formado parte del laboratorio durante los años en los que he estado. Me gustaría acordarme y agradecer a todos los compañeros que han estado o están en el laboratorio. Para empezar me gustaría acordarme de la gente que ya no está, empezando por los Doctores Pablo Dolz y Marta González de los que guardo un buen recuerdo puesto que fueron ellos los que me enseñaron el “arte” del patch clamp, pero que estuvieron poco tiempo con nosotros, pues escribieron sus tesis al poco de empezar yo la mía. También quería acordarme de los Doctores Mercedes Núñez y Ricardo Gómez, una estuvo conmigo desde que me incorporé allá por 2012 hasta 2015 y el otro tuvo una fugaz estancia por aquí, espero que os vaya bien allá donde estéis. Por supuesto agradecer a las súper mamás y Doctoras Irene Amorós y Adriana Barana por todo lo que me han enseñado, ellas también fueron mis “madres”

cuando aprendí a “andar” con el patch clamp, aunque no siempre les hiciera caso, siempre me aguantaron, un abrazo muy fuerte a las dos. Como no acordarme en estas líneas de Marta, la otra compañera con la que empecé esta aventura en el laboratorio y que ha desembocado en numerosos datos que nos hemos repartido para nuestras tesis, ¿uhm, quién leerá primero? Agradecer también a nuestra hasta hace poco única técnico Sandra por todo el trabajo que hace tanto en el hospital para traernos muestras como dentro del laboratorio, y por supuesto fuera, yendo de vez en cuando a algún concierto conmigo. La única pega es que no debería de quejarse tanto, pero después de hablar con su madre, llegamos a la conclusión de que eso es imposible. Las últimas líneas de este párrafo son para Paloma, que siempre ha estado y está con una sonrisa en la boca todos los días para ayudar en cualquier desaguizado, o para contar múltiples historias a la hora del café, ¡eres la mejor!

*“Eppur si muove” (“Y sin embargo, se mueve”)*

Galileo Galilei

(Frase atribuida a Galileo durante su abjuración de la teoría heliocéntrica, 1633)

Ahora toca acordarse de la gente nueva que ha entrado en el último año y que asegura la continuidad en el laboratorio. Un consejo importante, ¡no rompáis las cosas! o no habrá continuidad, que desde que entrasteis suceden fenómenos extraños, muy extraños, paranormales, jamás vistos por mis ojos, y *“he visto cosas que jamás creeríais...”*. Con todo esto y fuera de bromas, os deseo lo mejor durante vuestros años de doctorado, disfrutadlos al máximo pues se pasan volando. Estudiad, aprended, tened ideas, defendedlas, acertad u equivocaos pero sed siempre los más críticos con vosotros mismos. A Raquel y a Silvia vinculadas por los genes TBX, que claramente son gemelas separadas al nacer, más o menos como Danny DeVito y Arnold Schwarzenegger en “Los gemelos golpean dos veces”, eso sí, ya elegís vosotras quien es cada una. A Lorena, la nueva técnico de laboratorio, ¡no dejes que Sandra te deje todo el trabajo a ti, quéjate tu también! A Paloma, mi hispano-brasileña preferida (no conozco a otra, que se le va a hacer) cuyo futuro parece inexorablemente unido a canales de K<sup>+</sup> y heterotetrámeros. Y a David, el gran amante de los arácnidos, SAP97 y canales heterotetraméricos ¿qué diría el señor Lobo, David, qué diría?

*“¡Ah!, como me gustan los sábados de verdad, ¡uno descansa!, no como aquel miércoles-sábado que casi me despiden”*

Homer J Simpson

(*“Realty Bites”*, Los Simpsons, 1997)

## *Agradecimientos*

Como a Homer, a mi también me hubiera gustado hacer un miércoles-sábado alguna vez, pero no me ha sido posible, trabajamos toda la semana y aunque no estés en el mismo laboratorio al final acabas conociendo a mucha gente del departamento. Quería agradecer a toda la gente del departamento con la que he tenido contacto. En primer lugar a la Profesora María Isabel Colado, actual Directora del Departamento de Farmacología por acogerme durante estos 5 años, y a sus becarios, en especial a Pablo, con el que he coincidido muchas tardes interminables por los pasillos. A la Profesora Dolores Gutiérrez que siempre se interesó por el noble arte de la maestría cervecera y se dejó aconsejar por un servidor. A los Profesores Francisco Pérez Vizcaíno y Ángel Cogolludo, siempre que hemos necesitado material o ayuda para nuestro laboratorio, nos la han ofrecido y por supuesto a sus becarios, en especial a Dani (mi consultor personal a la hora de hacer papeles referentes a la tesis), a la Doctora Pandolfi (y eso que empezamos casi a la vez el doctorado) a María y a Gema (me encantan las bebidas espirituosas que esconde la nevera de vuestro laboratorio, ¡guardadlas con llave!). Al profesor Juan Carlos Leza, a sus pupilos (y núcleo duro de los Hombres de Farma) los Doctores Javier Caso y Borja García Bueno, porque se os echará mucho de menos (y sobre todo esas conversaciones por los pasillos) y, como no, a sus becarios Ara (con quien ya coincidí en carrera), Aline, María, Karina, Álvaro (siempre dispuesto a ir a un buen concierto de rock and roll), y por supuesto David, con quien he compartido multitud de tardes y noches (menos mal que nos quedaban las frases de Homer para echarnos siempre unas risas, ¿quién no quiere hacer un miércoles-sábado o utilizar fuego, y en cantidades de vez en cuando?) tanto en el departamento (al menos siempre había alguien con quien charlar un rato para no llegar hasta la locura) como fuera de él, y que al final ha desembocado en una gran amistad. También quería agradecer a los profesores Ignacio Lizasoain y María Ángeles Moro, y a sus becarios, Alicia, Sara, Alberto y Juan (“SAP97 brothers”), Maribel, Isabel, Jesús (que siempre me preguntaba por la Tesis), Macarena, Violeta y mucha más gente que se me olvida (son demasiados en este grupo), desde las siempre gratas conversaciones por los pasillos hasta cuando hemos necesitado cualquier material, siempre han estado dispuestos a ayudar. A Rober, el hijo pródigo que se fue (“Camino a la libertad”) y luego volvió a la Facultad, ¿con quién iba a ir a los conciertos de Heavy Metal si no (vale, también con Alberto)?, gracias amigo y si todo va bien, próximamente papá. Seguro que me dejo en el tintero a alguien más, que me perdone.

Asimismo, no me gustaría olvidarme del profesor Javier Díez-Guerra del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, con quien aprendí muchísimo acerca de microscopía confocal y FRET (lástima que no salieran los experimentos como queríamos). A toda la gente del laboratorio del profesor Hugues Abriel en el Departamento de Investigación Clínica de la Universidad de Berna, por acogerme durante esos tres maravillosos meses, en especial al profesor Abriel, una gran persona

y un gran científico que me ha enseñado bastante. Por supuesto, a J.S. (genio y figura), y por último a Valentin Sottas, con quién compartí proyecto de investigación durante aquellos meses de primavera, pues estoy muy agradecido no sólo por las técnicas que aprendí, entre ellas los ensayos de PLA que se exponen en esta Tesis (si, *Boss*, ya se que el N-terminal de sodio atrapa todas las proteínas accesorias imaginables), si no también por que es una magnífica persona y un buen amigo. A las chicas de microscopía del Centro de Investigaciones Biológicas, pues siempre me ayudaron en todo lo que pudieron aportando multitud de ideas para los experimentos de ICC. A los doctores Fernández-Avilés, Pinto y demás equipo de los servicios de Cardiología y de Cirugía Cardiovascular del Hospital General Universitario “Gregorio Marañón”, que nos han proporcionado las muestras auriculares humanas utilizadas en esta Tesis Doctoral. Al profesor José Jalife, a Daniela Ponce-Balbuena y a Guadalupe Guerrero-Serna del Centro de Investigación de Arritmias de la Universidad de Michigan con quien hemos colaborado para la publicación del manuscrito en el que está basada esta Tesis Doctoral.

Al Ministerio de Economía y Competitividad por financiar esta Tesis Doctoral por medio de una beca FPI desde el año 2012.

Quería acordarme de los compañeros del Máster de Biofísica con los que todavía quedo de vez en cuando para tomar unas cervezas y tener conversaciones apasionantes sobre física, biología, música, cine y videojuegos, que por fin vamos terminando nuestras respectivas tesis, Iñigo, Gonzalo y Jesús.

*“So understand  
Don't waste your time always searching for  
those wasted years  
Face up... make your stand  
And realise you're living in the golden years”*

Iron Maiden

(*“Wasted years”*, incluida en el disco *“Somewhere in time”*, 1986)

No quería terminar estos agradecimientos sin olvidarme, como diría Juanjo, de “los amigos de toda la vida”, gracias a Toni, Juanjo, Juan, Estrada, José Luis, Chaparro, Javi, Manu, Juanma, Miguel y Sergio por vivir estos “años dorados” conmigo.



# ÍNDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>I. RESUMEN/SUMMARY.....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>Resumen.....</b>  | <b>3</b>  |
| <b>Summary.....</b>  | <b>9</b>  |
| <b>II. INTRODUCCIÓN .....</b>  | <b>15</b> |
| <b>1. Electrofisiología cardiaca .....</b>   | <b>17</b> |
| 1.1. Excitabilidad .....   | 18        |
| 1.1.1. Transporte de iones a través de la membrana celular .....   | 20        |
| 1.1.2. El potencial de reposo .....  | 21        |
| 1.1.3. El potencial de acción .....  | 21        |
| <i>1.1.3.a. PA rápidos o dependientes de Na<sup>+</sup></i> .....  | 22        |
| <i>1.1.3.b. PA lentos o dependientes de Ca<sup>2+</sup></i> .....  | 24        |
| 1.2. Automatismo .....   | 24        |
| 1.3. Refractoriedad .....  | 25        |
| 1.4. Propagación del impulso cardiaco .....  | 26        |
| <b>2. Canales iónicos dependientes de voltaje implicados en el potencial de acción cardiaco .....</b>              | <b>28</b> |
| 2.1. Canales de Na <sup>+</sup> .....  | 28        |
| 2.2. Canales de Ca <sup>2+</sup> .....   | 28        |
| 2.2.1. Estructura de los canales de Ca <sup>2+</sup> .....   | 29        |
| 2.2.2. Características de la I <sub>Ca,L</sub> .....   | 31        |
| 2.3. Canales de K <sup>+</sup> voltaje-dependientes .....  | 32        |
| 2.3.1. Canales 6TM/1P .....  | 33        |
| 2.3.1.a. Estructura de los canales Kv .....  | 34        |
| <i>I. La subunidad <math>\alpha</math></i> .....   | 34        |
| <i>II. Subunidades auxiliares</i> .....  | 34        |
| 2.3.1.b. Principales corrientes generadas a través de canales Kv<br><i>que intervienen en el PA cardíaco</i> ..... | 36        |

|  |           |
|--|-----------|
| I. La $I_{tot}$ .....  | 37        |
| II. La $I_{Kur}$ .....   | 38        |
| III. La $I_{Kr}$ .....   | 39        |
| III.a. Características de la $I_{Kr}$ .....  | 40        |
| III.b. Composición de los canales que generan la $I_{Kr}$ .....                                | 41        |
| IV. La $I_{Ks}$ .....  | 41        |
| IV.a. Características de la $I_{Ks}$ .....   | 42        |
| IV.b. Composición de los canales que generan la $I_{Ks}$ .....                                 | 42        |
| <b>3. Canales que generan corrientes con rectificación interna .....</b>                       | <b>43</b> |
| 3.1. Una familia de canales de $K^+$ con rectificación interna .....                           | 43        |
| 3.2. Principales corrientes cardíacas generadas a través de canales $K_{ir}$ .....             | 45        |
| 3.2.1. La $I_{K,ATP}$ .....  | 45        |
| 3.2.1.a. Características de la $I_{K,ATP}$ y composición de los canales que la generan .....   | 45        |
| 3.2.1.b. Regulación de la $I_{K,ATP}$ .....  | 46        |
| 3.2.2. La $I_{K,ACh}$ .....  | 47        |
| 3.2.2.a. Características de la $I_{K,ACh}$ .....   | 47        |
| 3.2.2.b. Composición de los canales que generan la $I_{K,ACh}$ .....                           | 48        |
| 3.2.2.c. Regulación de la $I_{K,ACh}$ .....  | 49        |
| 3.3. La $I_{K1}$ .....   | 49        |
| 3.3.1. La rectificación interna en los canales $K_{ir}$ .....                                  | 49        |
| 3.3.1.a. Mecanismos moleculares de la rectificación interna .....                              | 51        |
| 3.3.1.b. Determinantes moleculares de la rectificación interna .....                           | 52        |
| 3.3.2. Estructura de los canales $K_{ir}$ .....  | 54        |
| 3.3.3. Rectificación interna y excitabilidad cardíaca .....                                    | 60        |
| 3.3.4. Densidad de la $I_{K1}$ en los distintos tejidos cardíacos .....                        | 61        |
| 3.3.5. Propiedades de los canales $K_{ir2}$ .....  | 63        |
| 3.3.6. Composición de los canales que generan la $I_{K1}$ .....                                | 64        |
| 3.3.7. Regulación de la $I_{K1}$ .....   | 66        |
| 3.3.8. La $I_{K1}$ en diversas patologías .....  | 72        |
| <b>4. Canales de <math>Na^+</math> .....</b>   | <b>77</b> |
| 4.1. Estructura de los canales de $Na^+$ .....   | 77        |
| 4.2. Características de la $I_{Na}$ .....  | 80        |
| 4.3. Regulación de los canales Nav1.5 por proteínas y modificaciones post-traduccionales ..... | 84        |

|   |            |
|---|------------|
| 4.4. Canalopatías asociadas a los canales de Na <sup>+</sup> cardíacos .....                                      | 91         |
| <b>5. Canalosomas en cardiomiocitos.....</b>  | <b>102</b> |
| 5.1. Polaridad celular en cardiomiocitos .....  | 102        |
| 5.2. Definición de canalosoma.....  | 104        |
| 5.3. Canalosomas de canales Kir2.x .....  | 104        |
| 5.4. SAP97 .....  | 107        |
| 5.5. Sintrofina.....  | 108        |
| 5.6. Dominios PDZ .....   | 110        |
| 5.6.1. Estructura de los dominios PDZ .....   | 110        |
| 5.6.2. Tipos de interacciones con dominios PDZ.....   | 111        |
| 5.7. Canalosomas formados por canales Kir2.1-Nav1.5.....  | 116        |
| 5.7.1. Modulación recíproca positiva Kir2.1-Nav1.5 .....  | 116        |
| 5.7.2. Proteínas implicadas en el tráfico y localización de los canales Kir2.1-Nav1.5.....                        | 118        |
| 5.7.3. Consecuencias clínicas.....  | 119        |
| <b>6. Arritmias por reentrada del impulso cardiaco.....</b>   | <b>120</b> |
| 6.1. Conceptos básicos .....  | 120        |
| 6.2. Evolución de las teorías de reentrada.....   | 121        |
| 6.3. Los rotors en la génesis de la FA .....  | 125        |
| 6.4. Papel de los canales iónicos.....  | 127        |
| 6.5. Futuro, implicaciones y perspectivas .....   | 130        |
| <b>III. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....</b>   | <b>133</b> |
| <b>IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>  | <b>137</b> |
| <b>1. Técnica de fijación de voltaje en parche de membrana (patch-clamp) .....</b>                                | <b>139</b> |
| <b>2. Registro de <math>I_{Kir2.x}</math> e <math>I_{Nav1.5}</math> en sistemas de expresión heterólogos.....</b> | <b>142</b> |
| 2.1. Mutagénesis dirigida de los canales hKir2.x y hNav1.5 .....  | 142        |
| 2.2. Cultivo y transfección de los canales hKir2.x y hNav1.5 en células CHO .....                                 | 143        |
| 2.3. Silenciamiento de SAP97 y $\alpha$ 1-sintrofina en células CHO .....   | 145        |
| 2.4. Técnicas de registro en sistemas de expresión heterólogos .....  | 146        |
| 2.5. Registro de $I_{Kir2.x}$ e $I_{Nav1.5}$ : Soluciones y protocolos experimentales .....                       | 147        |
| <b>3. Registro de <math>I_{K1}</math> e <math>I_{Na}</math> en miocitos auriculares humanos.....</b>              | <b>149</b> |

|  |            |
|--|------------|
| 3.1. Disociación enzimática de miocitos auriculares humanos .....  | 149        |
| 3.2. Técnicas de registro de la $I_{K1}$ e $I_{Na}$ auriculares humanas .....                                    | 151        |
| 3.3. Registro de la $I_{K1}$ e $I_{Na}$ auriculares humanas: Soluciones y protocolos experimentales.....         | 152        |
| <b>4. Registro de <math>I_{K1}</math> e <math>I_{Na}</math> en miocitos ventriculares de rata adulta .....</b>   | <b>153</b> |
| 4.1. Disociación enzimática de miocitos ventriculares de rata.....   | 153        |
| 4.2. Cultivo e infección de miocitos ventriculares de rata .....   | 153        |
| 4.3. Técnicas de registro de la $I_{K1}$ e $I_{Na}$ ventriculares de rata.....                                   | 155        |
| 4.4. Registro de la $I_{K1}$ e $I_{Na}$ ventriculares de rata: Soluciones y protocolos experimentales .....      | 156        |
| <b>5. Experimentos de <i>Western Blot</i> y co-inmunoprecipitación.....</b>                                      | <b>157</b> |
| 5.1. Preparación del lisado crudo de aurícula humana y ventrículo de rata, ratón y cobayo .....                  | 157        |
| 5.2. Extracción proteica de células CHO transfectadas.....   | 157        |
| 5.3. Cuantificación de proteínas.....  | 158        |
| 5.4. Co-inmunoprecipitación (Co-IP).....   | 158        |
| 5.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida, transferencia de proteínas a<br>membrana e inmunodetección ..... | 160        |
| <b>6. Microscopía de fluorescencia .....</b>   | <b>161</b> |
| 6.1. Ensayo de ligación por proximidad en la membrana de miocitos ventriculares de rata .....                    | 161        |
| 6.2. Determinación de la expresión de Kir2.1 en la membrana de células HEK293 .....                              | 163        |
| 6.2.1. Construcción de quimeras.....   | 163        |
| 6.2.2. Cultivo, transfección y fijación de células HEK293 .....  | 164        |
| 6.2.3. Microscopía confocal y análisis de imagen.....  | 165        |
| <b>7. Anticuerpos.....</b>   | <b>165</b> |
| <b>8. Análisis estadístico de los resultados .....</b>   | <b>165</b> |
| <b>V. RESULTADOS.....</b>  | <b>167</b> |
| <b>1. Efectos de la expresión de Nav1.5-<math>\beta</math> sobre los canales Kir2.x.....</b>                     | <b>169</b> |
| 1.1. Efectos de la expresión de Nav1.5- $\beta$ sobre la corriente $I_{Kir2.x}$ .....                            | 169        |
| 1.1.1. Características electrofisiológicas de la $I_{Kir2.1}$ .....  | 169        |
| 1.1.2. Características electrofisiológicas de la $I_{Kir2.2}$ e $I_{Kir2.3}$ .....                               | 170        |
| 1.1.3. Efectos de la expresión de canales Nav1.5- $\beta$ sobre la $I_{Kir2.1}$ .....                            | 172        |
| 1.1.4. Efectos de la expresión de canales Nav1.5- $\beta$ sobre la $I_{Kir2.2}$ y la $I_{Kir2.3}$ .....          | 174        |

|   |            |
|---|------------|
| 1.2. Efectos de Nav1.5 sobre la expresión de Kir2.1 en la membrana citoplasmática.....  | 175        |
| 1.3. Estudios de interacción entre los canales Nav1.5 y Kir2.x .....  | 177        |
| 1.3.1. Ensayos de co-inmunoprecipitación entre los canales Nav1.5 y Kir2.x.....   | 178        |
| 1.3.2. Ensayo de ligación por proximidad entre los canales Nav1.5 y Kir2.1 en la<br>membrana de miocitos ventriculares de rata..... | 180        |
| 1.4. Efectos de la expresión de Nav1.5- $\beta$ sobre las corrientes generadas por<br>heterotetrámeros de Kir2.x.....               | 182        |
| <b>2. Papel de la secuencia de unión a dominios PDZ de los canales Kir2.x .....</b>   | <b>184</b> |
| 2.1. Efectos de mutaciones en el dominio de unión a PDZ de canales Kir2.x en la<br>modulación recíproca de la $I_{Kir2.x}$ .....    | 185        |
| 2.2. Papel de la $\alpha$ 1-sintrofina en la modulación Kir2.x-Nav1.5 .....   | 188        |
| 2.2.1. Estudios de interacción entre los canales Kir2.x, Nav1.5 y la $\alpha$ 1-sintrofina.....                                     | 188        |
| <b>3. Papel de las proteínas de anclaje <math>\alpha</math>1-sintrofina y SAP97 en la modulación recíproca<br/>positiva .....</b>   | <b>193</b> |
| 3.1. Características electrofisiológicas de la $I_{Nav1.5-\beta}$ .....   | 193        |
| 3.2. Efectos del silenciamiento de SAP97 y $\alpha$ 1-sintrofina sobre la modulación<br>de $I_{Kir2.1}$ e $I_{Nav1.5}$ .....        | 196        |
| 3.2.1. Silenciamiento de $\alpha$ 1-sintrofina en células CHO .....   | 196        |
| 3.2.1.1. Efectos del silenciamiento de $\alpha$ 1-sintrofina sobre la $I_{Nav1.5-\beta}$ en<br>células CHO.....                     | 197        |
| 3.2.1.2. Efectos del silenciamiento de $\alpha$ 1-sintrofina sobre la $I_{Kir2.1}$ en<br>células CHO.....                           | 198        |
| 3.2.2. Silenciamiento de SAP97 en células CHO.....  | 199        |
| 3.2.2.1. Efectos del silenciamiento de SAP97 sobre la $I_{Nav1.5-\beta}$ en células CHO .....                                       | 200        |
| 3.2.2.2. Efectos del silenciamiento de SAP97 sobre la $I_{Kir2.1}$ en células CHO .....   | 201        |
| 3.3. Efectos del silenciamiento de $\alpha$ 1-sintrofina en miocitos ventriculares de rata .....                                    | 202        |
| 3.3.1. Características electrofisiológicas de la $I_{K1}$ registrada en miocitos<br>ventriculares de rata.....                      | 202        |
| 3.3.2. Características electrofisiológicas de la $I_{Na}$ registrada en miocitos<br>ventriculares de rata.....                      | 203        |
| 3.3.3. Efectos del silenciamiento de la $\alpha$ 1-sintrofina sobre la modulación de $I_{K1}$ e $I_{Na}$ .....                      | 204        |
| <b>4. Modulación recíproca positiva de Kir2.x y Nav1.5 en aurícula humana .....</b>   | <b>206</b> |
| 4.1. Características electrofisiológicas de la $I_{K1}$ registrada en miocitos auriculares humanos...                               | 207        |

|  |            |
|--|------------|
| 4.2. Características electrofisiológicas de la $I_{Na}$ registrada en miocitos auriculares humanos...                | 208        |
| 4.3. Efectos del aumento de la $I_{K1}$ sobre la $I_{Na}$ en aurícula humana.....                                    | 209        |
| 4.4. Estudio de la interacción entre Kir2.3, SAP97 y $\alpha$ 1-sintrofina en aurícula humana.....                   | 211        |
| <b>5. Papel de los extremos N- y C-terminales de los canales Nav1.5 en la modulación recíproca positiva.....</b>     | <b>212</b> |
| 5.1. Papel de la secuencia de unión a dominios PDZ situada en el extremo C-terminal .....                            | 212        |
| 5.2. Papel de dominio N-terminal de Nav1.5 .....   | 215        |
| 5.2.1. Efectos del fragmento Nter sobre la $I_{Kir2.x}$ y la $I_{Nav1.5}$ registradas en células CHO ....            | 215        |
| 5.2.2. Efectos del Nter en miocitos ventriculares de rata .....  | 217        |
| <b>6. Determinantes moleculares del “efecto chaperona” del Nter .....</b>  | <b>219</b> |
| 6.1 Papel de la secuencia RESLA en el “efecto chaperona”.....  | 220        |
| 6.2. Estudios de interacción de $\alpha$ 1-sintrofina con los dominios de unión a PDZ de Nav1.5 .....                | 222        |
| <b>VI. DISCUSIÓN.....</b>  | <b>225</b> |
| <b>1. Efectos de la expresión de Nav1.5-<math>\beta</math> sobre los canales Kir2.x.....</b>                         | <b>227</b> |
| 1.1. La expresión de Nav1.5- $\beta$ incrementa $I_{Kir2.1}$ e $I_{Kir2.2}$ pero no $I_{Kir2.3}$ .....               | 227        |
| <b>2. Papel del dominio de unión a PDZ de los canales Kir2.x.....</b>  | <b>228</b> |
| 2.1. La modulación recíproca positiva de los canales Kir2.x depende del motivo de unión a PDZ (SEI).....             | 228        |
| 2.2. La $\alpha$ 1-sintrofina interacciona con los canales Kir2.1-2.2, pero no con Kir2.3 .....                      | 230        |
| <b>3. Papel de <math>\alpha</math>1-sintrofina y SAP97 en la modulación recíproca positiva de Kir2.x-Nav1.5 ....</b> | <b>232</b> |
| 3.1. La $\alpha$ 1-sintrofina es la responsable de la modulación recíproca positiva de Kir2.x-Nav1.5.....            | 232        |
| 3.2. Los canales Kir2.1 y Nav1.5 forman complejos macromoleculares en la membrana .....                              | 233        |
| <b>4. Los canales Kir2.x y Nav1.5 no interaccionan en la aurícula humana .....</b>                                   | <b>234</b> |
| 4.1. Implicaciones fisiopatológicas de la interacción entre canales Kir2.1/2.2 y Nav1.5.....                         | 234        |
| <b>5. Papel de los extremos N- y C-terminales de Nav1.5 sobre la modulación de canales Kir2.x .....</b>              | <b>235</b> |
| <b>6. Determinantes moleculares del “efecto chaperona” del Nter .....</b>  | <b>236</b> |
| 6.1. Características de la secuencia de unión a PDZ presente en el dominio N-terminal de Nav1.5.....                 | 239        |

|  |            |
|--|------------|
| 6.2. Localización del canalosoma Nav1.5-Kir2.1/2.2 ..... | 240        |
| <b>VII. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS .....</b>               | <b>243</b> |
| <b>Conclusiones .....</b>                                | <b>245</b> |
| <b>Conclusions .....</b>                                 | <b>247</b> |
| <b>VIII. ABREVIATURAS .....</b>                          | <b>249</b> |
| <b>IX. BIBLIOGRAFÍA .....</b>                            | <b>255</b> |
| <b>X. PUBLICACIONES .....</b>                            | <b>293</b> |



# **I. Resumen/Summary**



## RESUMEN

### “DETERMINANTES MOLECULARES DE LA INTERACCIÓN ENTRE LOS CANALES CARDIACOS HUMANOS Nav1.5 Y Kir2.x”

#### INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La corriente de sodio cardíaca ( $I_{Na}$ ), generada por los canales Nav1.5, es la responsable de la entrada de  $Na^+$  que despolariza la membrana durante el potencial de acción (PA) regulando la excitabilidad y la propagación del impulso cardíaco. Por otro lado, la corriente de salida de  $K^+$  con rectificación interna ( $I_{K1}$ ), generada por los canales Kir2.x, es la responsable de establecer el potencial de reposo así como de modular la fase final de la repolarización y la duración del PA (DPA) en los miocitos cardíacos. Por tanto, la  $I_{K1}$  participa en el control de la excitabilidad y la refractariedad cardíacas. La magnitud de la  $I_{Na}$  depende del potencial de reposo y de la DPA, por ello se afirma que existe una relación funcional entre la  $I_{Na}$  y la  $I_{K1}$ . Además, se ha demostrado que la relación de las magnitudes de la  $I_{Na}$  y la  $I_{K1}$  determinan de forma crítica la estabilidad y velocidad de giro de los frentes de reentrada espirales (rotors) responsables de la génesis de las arritmias fibrilatorias tanto a nivel auricular como ventricular.

Recientemente se ha demostrado que los canales Nav1.5 y Kir2.1 modulan recíprocamente su expresión en la membrana, de esta forma el aumento o la disminución en la expresión de canales Kir2.1 produce un aumento o disminución en la expresión de canales Nav1.5 y, viceversa. Estos resultados sugerían que la relación de las magnitudes de la  $I_{Na}$  y la  $I_{K1}$  es tan importante para el control de la excitabilidad y refractariedad cardíacas que su modulación no sólo es funcional.

En este momento se desconocen los determinantes moleculares y los mecanismos celulares responsables de la modulación recíproca positiva entre canales Nav1.5 y Kir2.1. Se desconoce también si se produce modulación recíproca positiva entre los canales Nav1.5 y los Kir2.2 y Kir2.3. Este hecho tiene una gran relevancia funcional, considerando que la  $I_{K1}$  ventricular es generada por canales Kir2.1/Kir2.2, mientras que los canales Kir2.3 parecen jugar un papel predominante en la génesis de la  $I_{K1}$  auricular.

Las proteínas de anclaje SAP97 y  $\alpha 1$ -sintrofina determinan la localización y regulan la función de los canales Nav1.5 y Kir2.x en los miocitos cardíacos. Estas proteínas de anclaje se unen, a través de sus dominios PDZ, a las secuencias consenso de unión a dominios PDZ (S/T-X-V/I/L),

que se encuentran localizadas en el extremo C-terminal de estos canales. De hecho, SAP97 se une con la misma afinidad a los tres canales de la familia Kir2.x, mientras que la  $\alpha 1$ -sintrofina, se une con mayor afinidad a Kir2.1 y Kir2.2 que a Kir2.3. Por tanto, dada la importancia de dichas proteínas de anclaje en la expresión y función de los canales Nav1.5 y Kir2.x, nuestra hipótesis es que podrían estar involucradas en la modulación recíproca positiva.

Por todo lo anteriormente descrito, sería de interés identificar los determinantes moleculares y los posibles mecanismos celulares responsables de la modulación recíproca positiva entre canales Nav1.5 y Kir2.1 y, si la hubiere, entre canales Nav1.5 y Kir2.2/Kir2.3.

Para ello se han realizado experimentos de electrofisiología, así como experimentos de biología molecular en líneas celulares de mamífero y en miocitos cardiacos, con los objetivos específicos de:

1) Analizar los efectos producidos por la expresión de los canales cardiacos humanos Nav1.5 sobre la corriente  $I_{K1}$  generada por homo- y heterotetrámeros de canales Kir2.1, Kir2.2 y Kir2.3 expresados en líneas celulares de mamífero.

2) Identificar el papel que juegan las proteínas de anclaje  $\alpha 1$ -sintrofina y SAP97 en la modulación recíproca positiva entre los canales Nav1.5 y Kir2.x en sistemas de expresión heterólogos, en miocitos ventriculares de rata y en miocitos auriculares humanos obtenidos mediante disociación enzimática y en tejido cardiaco de ratón, rata y cobayo.

3) Determinar las repercusiones a nivel funcional de la modulación recíproca positiva entre los canales Nav1.5 y Kir2.x en miocitos auriculares disociados enzimáticamente y procedentes de muestras de pacientes en ritmo sinusal y con fibrilación auricular crónica en los que la corriente generada por los canales Kir2.x aumenta como consecuencia del remodelado eléctrico.

4) Identificar los determinantes moleculares que intervienen en la modulación recíproca positiva entre los canales Nav1.5 y Kir2.x mediante la utilización de diversos mutantes localizados en los extremos N- y C-terminales de ambos canales.

## MÉTODOS Y RESULTADOS

Todas las corrientes se registraron utilizando la técnica de *patch clamp* en configuración de célula entera en células CHO transfectadas de forma transitoria, en miocitos ventriculares de rata adulta y en miocitos humanos disociados enzimáticamente procedentes de aurículas de pacientes con ritmo sinusal y con fibrilación auricular crónica sometidos a cirugía cardíaca.

Tanto los ensayos de co-inmunoprecipitación como de *western blot* se llevaron a cabo en lisado de células CHO transfectadas transitoriamente, y en muestras auriculares humanas o ventriculares de ratas, ratones o cobayos.

El análisis de *Proximity ligation assay* (PLA) entre los canales Kir2.1 y Nav1.5 se llevó a cabo, mediante microscopía confocal, en miocitos ventriculares de rata adulta disociados enzimáticamente y fijados sin permeabilizar la membrana celular. La cuantificación de la expresión en la membrana citoplasmática de canales Kir2.1 coexpresados o no con canales Nav1.5 se realizó en células HEK transfectadas transitoriamente con los canales marcados con proteínas fluorescentes.

La participación de la  $\alpha$ -1-sintrofina y SAP97 en la modulación recíproca positiva se analizó en células CHO en las que la expresión de dichas proteínas de anclaje se silenciaba mediante ARN de interferencia (siRNAs) específicos. El silenciamiento de la  $\alpha$ 1-sintrofina en miocitos ventriculares de rata se realizó mediante construcciones adenovirales que codificaban ARN de interferencia (shRNA).

Todas las mutaciones de los canales Kir2.x y Nav1.5 para el estudio de los determinantes moleculares de la interacción entre estos canales se realizaron mediante mutagénesis dirigida y fueron confirmadas mediante la secuenciación.

Mediante la utilización de estas técnicas se obtuvieron los siguientes resultados:

Los canales Nav1.5 aumentan la  $I_{Kir2.1}$  e  $I_{Kir2.2}$ , pero no la corriente generada por canales homo- o heterotetraméricos que contengan subunidades de Kir2.3. Los experimentos de co-inmunoprecipitación confirmaron que tanto los canales Kir2.1 como los Kir2.2 interaccionan con los canales Nav1.5, pero no con los canales Kir2.3. Además, los experimentos de microscopía confocal demostraron que la transfección de Nav1.5 junto con canales Kir2.1 incrementa la expresión en la membrana celular de Kir2.1 y que ambos canales se encuentran a una distancia menor a 40 nm en la membrana celular de los cardiomiocitos.

La interacción recíproca positiva de los canales Nav1.5-Kir2.x depende de una secuencia específica de unión a dominios PDZ situada en el extremo C-terminal (SEI), que está presente en los canales Kir2.1 y Kir2.2 pero no en Kir2.3 (SAI). De tal forma que los canales Nav1.5 son capaces de tanto modular positivamente como co-inmunoprecipitar con los canales mutantes Kir2.3 que poseen el dominio de unión a PDZ de Kir2.1/2.2 (Kir2.3 A444E), pero no con los canales mutantes Kir2.1/2.2 que tienen el dominio de unión a PDZ de Kir2.3 (Kir2.1 E426A y Kir2.2 E432A). Además, se observó que en miocitos auriculares humanos, el aumento de la  $I_{K1}$  producido como consecuencia del remodelado eléctrico que ocurre en fibrilación auricular no se acompaña de un aumento de la  $I_{Na}$ .

El silenciamiento de la  $\alpha$ 1-sintrofina pero no el de SAP97 en células CHO abolía la modulación recíproca positiva entre canales Kir2.1 y Nav1.5. Además, el silenciamiento de  $\alpha$ 1-sintrofina en miocitos ventriculares de rata disminuía tanto  $I_{K1}$  como  $I_{Na}$ . Más aún, los experimentos demostraron

que los canales Nav1.5, Kir2.1, y Kir2.2 interaccionan con la  $\alpha$ 1-sintrofina a través de las secuencias lineales de unión a dominios PDZ.

Gracias a la realización de mutagénesis dirigida y efectuando experimentos de electrofisiología y co-inmunoprecipitación, se observó que los canales Nav1.5 se unen a la proteína de anclaje  $\alpha$ 1-sintrofina mediante dos secuencias de unión a dominios PDZ: una localizada en el extremo C-terminal del canal (SIV), que es la canónica y otra “interna”, que no posee residuo carboxilo libre, que está localizada en el dominio N-terminal del canal (18-RESLA-22) y cuya serina en posición 20 es fundamental para la interacción. De tal forma que cuando se mutan estas dos secuencias de unión a dominios PDZ, Nav1.5 no interacciona con  $\alpha$ 1-sintrofina.

Por último, el péptido N-terminal del canal Nav1.5, que comprende los 132 primeros aminoácidos del canal, ejerce *per se* un “efecto chaperona” sobre los canales que interaccionan con  $\alpha$ 1-sintrofina (Kir2.1, Kir2.2 y Nav1.5) a través de sus dominios de unión a PDZ C-terminales. A tal efecto el dominio N-terminal se une a la  $\alpha$ 1-sintrofina mediante a la secuencia "interna" de unión a PDZ. La mutación del residuo serina en posición 20 abole el “efecto chaperona” del dominio N-terminal.

Todos estos resultados demuestran el papel fundamental que juegan tanto el dominio N-terminal de Nav1.5, la  $\alpha$ 1-sintrofina y el extremo C-terminal de los canales Kir2.1/Kir2.2 (SEI) en la interacción recíproca positiva de los canales Nav1.5-Kir2.x y sugieren que los mecanismos moleculares que controlan la excitabilidad celular en aurícula y ventrículo pueden ser diferentes.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral en sistemas de expresión heterólogos, miocitos ventriculares de rata y miocitos auriculares humanos nos han permitido obtener las siguientes conclusiones:

- 1) En la membrana de los miocitos cardiacos, los canales Nav1.5 y Kir2.1 se encuentran a una distancia menor de 40 nm, lo que sugiere que interaccionan entre sí formando parte de un mismo canalosoma.
- 2) La expresión de los canales Nav1.5 aumenta la densidad de la corriente generada por homo- y heterotetrámeros de canales Kir2.1 y Kir2.2, pero no la generada por homo- o heterotetrámeros de canales Kir2.3.

- 3) En los miocitos auriculares humanos, el aumento de la  $I_{K1}$  producido por la fibrilación auricular no se acompaña de un aumento de la  $I_{Na}$ . Este resultado se explica por la presencia de canales Kir2.3 en el tejido auricular humano. Por tanto, proponemos que la modulación recíproca positiva entre la  $I_{Na}$  y la  $I_{K1}$  se producirá exclusivamente en el tejido ventricular.
  
- 4) La modulación recíproca positiva depende de forma crítica de la unión de los canales Kir2.x y Nav1.5 a través de sus dominios lineales de unión a PDZ, a la proteína de anclaje  $\alpha 1$ -sintrofina. SAP97, si bien controla la expresión y/o función de los canales Kir2.x y Nav1.5, no participa en su modulación recíproca positiva.
  
- 5) Los canales Nav1.5 pueden interaccionar con la  $\alpha 1$ -sintrofina a través de dos secuencias de unión a dominios PDZ: una canónica, localizada en el extremo C-terminal y otra "interna", que carece de residuo carboxilo libre, localizada en el dominio N-terminal y en la que la serina en posición 20 es crítica.
  
- 6) El dominio N-terminal del canal Nav1.5 *per se* ejerce efecto "chaperona" uniéndose a través de su secuencia de unión a PDZ "interna" a la  $\alpha 1$ -sintrofina. Los canales que pueden unirse a la  $\alpha 1$ -sintrofina (Kir2.1, Kir2.2 y Nav1.5 pero no Kir2.3) son capaces de ser modulados positivamente por el dominio N-terminal de los canales Nav1.5.



## SUMMARY

### “MOLECULAR DETERMINANTS OF THE INTERACTION BETWEEN HUMAN CARDIAC Nav1.5 AND Kir2.x CHANNELS”

#### INTRODUCTION AND OBJECTIVES

The cardiac inward Na<sup>+</sup> current ( $I_{Na}$ ) generated by Nav1.5 channels, that is responsible for the Na<sup>+</sup> influx that depolarizes the membrane potential during the action potential (AP) upstroke, plays a critical role in cardiac excitability and impulse propagation. The strong inward rectifier current ( $I_{K1}$ ), generated by Kir2.x channels, is the key K<sup>+</sup> current responsible for setting the resting membrane potential and modulating the late-phase of repolarization and AP duration (APD) in cardiac cells. Thus,  $I_{K1}$  is critical for controlling cardiac excitability and refractoriness. The  $I_{Na}$  magnitude depends on the resting membrane potential and APD and, thus, there is a functional relationship between the  $I_{Na}$  and the  $I_{K1}$ . In addition, it has been demonstrated that the ratio between the  $I_{Na}$  and the  $I_{K1}$  magnitudes critically determines the stability and rotation frequency of the spiral reentry wavefronts (rotors) responsible for the genesis of fibrillatory arrhythmias at the atrial and ventricular levels.

It has recently been demonstrated that the Nav1.5 and Kir2.1 channels reciprocally modulate their expression in the membrane, thus increasing or decreasing Kir2.1 expression produces an increase or decrease in the expression of Nav1.5 channels and, *vice versa*. These results suggested that the ratio between the  $I_{Na}$  and  $I_{K1}$  magnitudes is so important for the control of cardiac excitability and refractoriness that their modulation is not simply functional.

The molecular determinants responsible for the reciprocal modulation between the Nav1.5 and Kir2.1 channels are unknown at this time. It is also unknown whether a positive reciprocal modulation is also produced among Nav1.5 channels and Kir2.2 and Kir2.3 channels a clinically relevant issue, considering that ventricular  $I_{K1}$  is generated by Kir2.1 / Kir2.2 channels, whereas Kir2.3 channels seem to play a predominant role in the genesis of atrial  $I_{K1}$ .

The scaffolding proteins SAP97 and  $\alpha$ 1-syntrophin determine the localization and regulate the function of Nav1.5 and Kir2.x channels in cardiac myocytes. These anchoring proteins bind, through their PDZ domains, to the consensus sequences of PDZ-binding motifs (S/T-X-V/I/L), which are located at the C-terminus of these channels. In fact, SAP97 binds with the same affinity to the three channels of the Kir2.x family, whereas the  $\alpha$ 1-syntrophin binds with greater affinity to

Kir2.1 and Kir2.2 than to Kir2.3. Therefore, given the importance of such anchoring proteins in the expression and function of the Nav1.5 and Kir2.x channels, our hypothesis is that they could be involved in the positive reciprocal modulation.

Therefore, it would be of interest to identify the molecular determinants responsible for the positive reciprocal modulation between the Nav1.5 and Kir2.1 channels and, if any, between Nav1.5 and Kir2.2 / Kir2.3 channels.

Electrophysiological, as well as molecular biology experiments in mammalian cell lines and in cardiac myocytes, have been carried out pursuing the following objectives:

1) To Analyze the effects produced by the expression of human cardiac Nav1.5 channels on the  $I_{K1}$  generated by homo- and heterotetramers of Kir2.1, Kir2.2 and Kir2.3 channels expressed in mammalian cell lines.

2) To identify the role of the scaffolding proteins  $\alpha$ 1-syntrophin and SAP97 in the positive reciprocal modulation between the Nav1.5 and Kir2.x channels in heterologous expression systems, rat ventricular and human atrial myocytes as well as mouse, rat, and guinea-pig cardiac tissue.

3) To determine the functional consequences of the positive reciprocal modulation between the Nav1.5 and Kir2.x channels in enzymatically isolated atrial myocytes from samples of patients in sinus rhythm and with chronic atrial fibrillation in whom the current generated by the Kir2.x channels increases as a result of electrical remodeling.

4) To identify the molecular determinants that control the positive reciprocal modulation between the Nav1.5 and Kir2.x channels by the use of several mutants located at the N- and C-terminus of both channels.

## **METHODS AND RESULTS**

All currents were recorded using the whole-cell configuration of the patch-clamp technique in transiently transfected Chinese hamster ovary (CHO) cells, in adult rat ventricular myocytes, and in enzymatically isolated myocytes from atria of patients in sinus rhythm and with chronic atrial fibrillation.

Co-immunoprecipitation and western blot assays were performed on the lysate of transiently transfected CHO cells, and on human atrial or ventricular samples of rats, mice or guinea-pigs.

Proximity ligation assay between the Kir2.1 and Nav1.5 channels was performed by confocal microscopy on adult rat ventricular myocytes fixed without permeabilizing the cell membrane. Quantification of the expression at the cytoplasmic membrane of Kir2.1 channels co-expressed or

not with Nav1.5 channels was performed in human embryonic kidney (HEK) cells transiently transfected with channels labeled with fluorescent proteins.

The involvement of  $\alpha$ 1-syntrophin and SAP97 in the positive reciprocal modulation was analyzed in CHO cells in which the expression of mentioned anchoring proteins was silenced by specific small interfering RNAs (siRNAs). The silencing of  $\alpha$ 1-syntrophin in rat ventricular myocytes was performed by adenoviral constructs encoding short hairpin RNA (shRNA).

Kir2.x and Nav1.5 channel mutations for the study of the molecular determinants of the interaction between these channels were obtained by site-directed mutagenesis and were confirmed by DNA sequencing.

The main results obtained were as follows:

Nav1.5 channels increase  $I_{Kir2.1}$  and  $I_{Kir2.2}$ , but not the current generated by homo- or heterotetrameric channels containing Kir2.3 subunits. Co-immunoprecipitation experiments confirmed that Kir2.1 and Kir2.2 channels interact with Nav1.5 channels, but not with Kir2.3 channels. In addition, confocal microscopy experiments demonstrated that transfection of Nav1.5 along with Kir2.1 channels increases the expression of Kir2.1 in the cell membrane and that both channels are located at a distance shorter than 40 nm apart in the cell membrane of the cardiomyocytes.

The positive reciprocal modulation of Nav1.5-Kir2.x channels depends on a specific C-terminal (SEI) PDZ-binding motif, which is present in the Kir2.1 and Kir2.2 channels but not in Kir2.3 (SAI). In fact, Nav1.5 channels positively modulate and co-immunoprecipitate with a Kir2.3 mutant (Kir2.3 A444E) harboring the Kir2.1/2.2 PDZ-binding domain, but not with the Kir2.1/2.2 mutants harboring the PDZ-binding domain of Kir2.3 channels (Kir2.1 E426A and Kir2.2 E432A). In addition, it was observed that in human atrial myocytes, the  $I_{K1}$  increase produced as a consequence of the electrical remodeling induced by atrial fibrillation is not accompanied by an increase in the  $I_{Na}$ .

The silencing of  $\alpha$ 1-syntrophin but not the silencing of SAP97 in CHO cells abolishes the positive reciprocal modulation between Kir2.1 and Nav1.5 channels. In addition, in rat ventricular myocytes silencing of  $\alpha$ 1-syntrophin decreased both  $I_{K1}$  and  $I_{Na}$ . Moreover, the experiments demonstrated that the Nav1.5, Kir2.1, and Kir2.2 channels interact with  $\alpha$ 1-syntrophin via their PDZ binding motifs.

Site-directed mutagenesis, electrophysiological, and co-immunoprecipitation experiments, demonstrated that Nav1.5 channels bind to  $\alpha$ 1-syntrophin by means of two PDZ domain binding sequences: one located at the C-terminus (SIV), which is the canonical one, and an “internal” one, which has no free terminal carboxyl residue. This internal PDZ binding motif is located in the N-

terminal domain of the channel (18-RESLA-22) being the serine at position 20 critical for the interaction with  $\alpha$ 1-syntrophin. Thus, when these two PDZ-binding sequences are mutated, Nav1.5 does not interact at all with  $\alpha$ 1-syntrophin.

Finally, the N-terminal peptide of the Nav1.5 channel, comprising the first 132 amino acids, exerts a “chaperone-like effect” on the channels that interact with  $\alpha$ 1-syntrophin (Kir2.1, Kir2.2 and Nav1.5) through their C-terminal PDZ-binding domains. To this end, the N-terminal domain binds to  $\alpha$ 1-syntrophin by the “internal” PDZ-binding sequence. The mutation of the serine residue at position 20 abolishes the “chaperone-like effect” of the N-terminal domain.

All these results demonstrate the key role played by the N-terminal domain of Nav1.5, the  $\alpha$ 1-syntrophin, and the C-terminal sequence of the Kir2.1/Kir2.2 (SEI) channels in the reciprocal positive interaction between Nav1.5 and Kir2.x channels suggesting that the molecular mechanisms controlling cellular excitability in the atrium and ventricle may be different.

## **CONCLUSIONS**

The results of this Doctoral Thesis obtained in heterologous expression systems, rat ventricular myocytes, and human atrial myocytes led us to the following conclusions:

- 1) Nav1.5 and Kir2.1 channels are located at less than 40 nm apart from each other at the membrane of cardiac myocytes, suggesting that they interact between them and form part of the same channelosome.
- 2) Expression of Nav1.5 channels increases the density of the current generated by Kir2.1 and Kir2.2 homo- and heterotetramers, but not that generated by Kir2.3 homo- and heterotetramers.
- 3) In human atrial myocytes, the atrial fibrillation-induced increase of the  $I_{K1}$  is not accompanied by an increase in the  $I_{Na}$ . This result can be explained by the presence of Kir2.3 channels in the human atrial tissue. Therefore, we propose that the positive reciprocal modulation between the  $I_{Na}$  and the  $I_{K1}$  will be produced, exclusively, in the ventricular tissue.
- 4) The positive reciprocal modulation critically depends on the binding of both Kir2.x and Nav1.5 channels through their lineal PDZ-binding domains, to  $\alpha$ 1-syntrophin. SAP97, which controls the expression and/or function of Kir2.x and Nav1.5 channels, is not involved in their positive reciprocal modulation

5) Nav1.5 channels can interact with  $\alpha$ 1-syntrophin through two PDZ-binding domain sequences. The first one is the canonical sequence located at the C-terminus (SIV). The second one, or “internal”, lacks the free carboxylate group and is located at the N-terminal domain and determined by serine at position 20.

6) Nav1.5 N-terminal domain *per se* exerts a “chaperone-like” effect by binding to  $\alpha$ 1-syntrophin through its internal PDZ-binding sequence. The channels that complex with  $\alpha$ 1-syntrophin (Kir2.1, Kir2.2 and Nav1.5) are amenable to be positively modulated by the N-terminal domain of Nav1.5 channels.

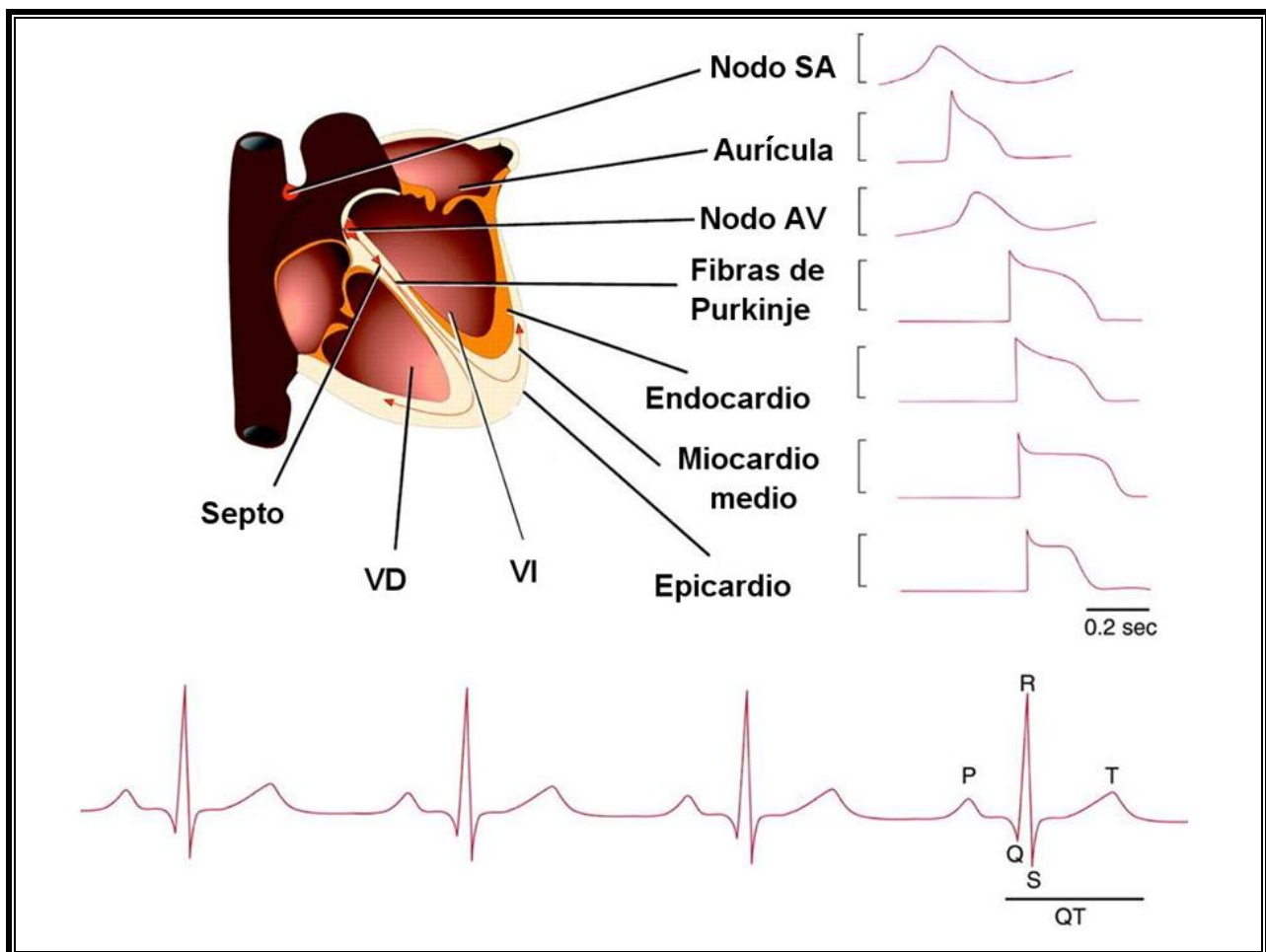


## **II. Introducción**



## 1. ELECTROFISIOLOGÍA CARDIACA

El corazón es un órgano que actúa a modo de bomba, enviando sangre a los distintos tejidos del organismo. Para llevar a cabo su función presenta tejidos especializados en los que se generan automáticamente impulsos que se conducen de forma organizada y provocan la contracción periódica del miocardio. El corazón está formado por tres tipos de tejido: los músculos auriculares y ventriculares, de los que depende su capacidad contráctil, y las fibras del tejido especializado de conducción, encargadas de la transmisión de los impulsos a través del corazón.



**Figura II.1. Representación esquemática de la actividad eléctrica en el miocardio.** Se observan los potenciales de acción registrados en diversas zonas del tejido cardíaco y su correlación con el electrocardiograma de superficie. [Adaptada de Nerbonne y Kass, 2005]

En condiciones fisiológicas, el impulso cardíaco nace en el nodo senoauricular (SA), estructura que se localiza en la confluencia de la vena cava superior con la orejuela derecha y la pared lateral de la aurícula derecha (Figura II.1). El nodo SA genera unos 60-90 potenciales de acción (PA) por minuto que se propagan sin disminución de amplitud hasta que todas las células cardíacas son excitadas. Desde el nodo SA, el impulso se propaga por todo el tejido auricular a una velocidad de

## Introducción

0.3 m/s para, a continuación, llegar al nodo aurículo-ventricular (AV), único punto que permite la comunicación eléctrica entre aurículas y ventrículos en condiciones fisiológicas. En el nodo AV, el estímulo se ralentiza antes de pasar al ventrículo (0.01-0.05 m/s). El impulso pasa después a las fibras de transición y al sistema de His-Purkinje, a través del cual se conduce muy rápidamente (2-4 m/s). El haz de His se bifurca en una rama derecha y varias izquierdas, que acaban ramificándose profusamente en fibras de Purkinje, desde donde la activación se extiende por el músculo ventricular, empezando por el septo medio izquierdo y la base de los músculos papilares y, de ahí, al resto de los ventrículos. La rápida velocidad de conducción intraventricular (0.3-4 m/s) tiene como misión permitir que ambos ventrículos se contraigan de forma sincrónica en un corto espacio de tiempo, algo esencial para que se realice de forma eficaz la función de bomba (Hoffman y Cranefield, 1960; Delpón y Tamargo, 2005).

Para comprender este complejo mecanismo, que se repite con cada latido, es necesario conocer algunas propiedades de las células cardiacas tales como la excitabilidad, el automatismo, la refractariedad y la conducción del impulso cardiaco.

### 1.1. Excitabilidad

La membrana citoplásmica es una barrera que separa dos medios acuosos de diferente composición. Pese a su diferente composición, tanto el medio intracelular como el extracelular han de cumplir el principio de neutralidad eléctrica (la suma de cargas positivas y negativas en el mismo medio debe ser cero) y de equilibrio osmótico (la presión osmótica debe ser idéntica a ambos lados de la membrana). Esta diferencia en la composición de ambos medios origina un gradiente de concentración que induce la difusión de moléculas desde el medio donde están más concentradas hacia el medio en el que lo están menos (Tabla II.1). Termodinámicamente, la difusión es un proceso que disminuye el orden del sistema (es decir, que aumenta su entropía), lo que implica que la difusión libera energía. Nernst cuantificó esta energía como una variación de potencial eléctrico:

$$\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln([ion]_e/[ion]_i) \quad (II.1)$$

donde  $\Delta G$  es la energía de Gibbs liberada en el proceso de difusión,  $R$  es la constante universal de los gases (8.31 J/mol·K),  $T$  es la temperatura absoluta y  $[ion]_e$  e  $[ion]_i$  son las concentraciones extra e intracelulares del ion que difunde. En el caso de una membrana únicamente permeable al  $K^+$ , éste difundirá desde el interior (donde está más concentrado) hacia el exterior de la célula (donde

está menos concentrado), por lo que en el interior se acumularán más cargas negativas, con lo que volverá a atraer iones  $K^+$  hacia el interior de la célula. La energía de atracción también puede cuantificarse:

$$\Delta G = -E \cdot z \cdot F \quad (\text{II.2})$$

donde  $E$  es el potencial transmembrana,  $z$  es el número de oxidación del ion en cuestión y  $F$  es la constante de Faraday ( $9.65 \cdot 10^4$  C/mol). A medida que el  $K^+$  va saliendo de la célula, el gradiente eléctrico se iguala al gradiente químico (de concentración) que causa la difusión:

$$E \cdot z \cdot F = R \cdot T \cdot \ln([ion]_e/[ion]_i) \quad (\text{II.3})$$

Reordenando los términos de la igualdad, se obtiene la “ecuación de Nernst” (Nernst, 1888):

$$E = (R \cdot T / z \cdot F) \cdot \ln([ion]_e/[ion]_i) \quad (\text{II.4})$$

El potencial al cual el flujo neto a través de la membrana de un ion es nulo recibe el nombre de “potencial de equilibrio” (Tabla II.1) y su valor viene dado por la ecuación de Nernst.

| Ion              | [Ion] <sub>e</sub> (mM) | [Ion] <sub>i</sub> (mM) | Potencial de equilibrio |
|------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Na <sup>+</sup>  | 135-145                 | 12                      | +67                     |
| K <sup>+</sup>   | 3.5-5                   | 155                     | -96                     |
| Cl <sup>-</sup>  | 123                     | 4.2                     | -90                     |
| Ca <sup>2+</sup> | 1.5                     | 10 <sup>-4</sup> nM     | +129                    |

**Tabla II.1. Concentraciones extra e intracelulares de los principales iones en condiciones fisiológicas.** Los potenciales de equilibrio para cada ion se han obtenido mediante la ecuación de Nernst para una temperatura de 37°C.

La diferencia de potencial que existe a ambos lados de la membrana se denomina potencial de membrana ( $E_m$ ) y viene determinado por la concentración de iones a uno y a otro lado de la misma, así como por la permeabilidad de la membrana a cada ion (Hoffman y Cranefield, 1960). Pero, además, algunas células como las nerviosas y las musculares son excitables: son capaces de variar esta diferencia de potencial generando impulsos eléctricos (o PA) en respuesta a un estímulo mediante el intercambio de iones entre los medios intra y extracelular. En el miocardio, estos impulsos se propagan para convertirse en el factor determinante de la contracción rítmica del corazón. El control del intercambio iónico resulta además esencial para evitar una excesiva presión osmótica debida a los cambios en la osmolaridad de ambos medios.

### 1.1.1. Transporte de iones a través de la membrana celular

En condiciones de reposo, el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{Ca}^{2+}$  están más concentrados en el medio extracelular, mientras que el  $\text{K}^+$  y los aniones orgánicos (proteínas, ATP,...) son los que predominan en el medio intracelular. El transporte de iones a través de la membrana se produce a favor de gradiente de concentración (sin gasto de energía) o en contra de gradiente (y, por lo tanto, con gasto energético) y requiere de sistemas especializados de transporte como los canales iónicos o las proteínas transportadoras.

Los canales iónicos son proteínas transmembrana (TM) cuyas principales funciones son:

- Formar poros hidrófilos a través de los cuales los iones atraviesan la membrana a favor de gradiente de concentración y de potencial eléctrico (gradiente electroquímico), permitiendo el paso de iones masivamente (hasta  $10^8$  iones/s) y generando una corriente iónica.
- Discriminar los iones que pasan a su través, gracias a un filtro de selectividad. El mecanismo de selectividad se basa tanto en el tamaño del ion como en su carga, de modo que ciertos residuos del canal se alinean en el poro e interaccionan con los iones formando barreras termodinámicas que favorecen el paso de unos iones frente a otros.
- Controlar la permeabilidad de la membrana a cada ion mediante la transición entre los diferentes estados del canal. Entre los diferentes estados del canal se encuentran, al menos, un estado abierto y uno o más no conductores (estados cerrado e inactivo). Los cambios conformacionales de la proteína entre los distintos estados son lo que se denomina el *gating* del canal y se producen de forma muy rápida ( $<10 \mu\text{s}$ ). Según el estímulo que origine estos cambios conformacionales, los canales se clasifican en canales dependientes de voltaje (dependen del  $E_m$ ), canales activados por ligando (el proceso de apertura y cierre depende de la unión de factores externos como hormonas o neurotransmisores) y canales operados por segundos mensajeros (el *gating* está regulado por factores intracelulares como el  $\text{Ca}^{2+}$  o subunidades de proteínas G). En el caso de los canales dependientes de voltaje, la proteína presenta una serie de aminoácidos que se encuentran cargados a pH fisiológico y que se mueven en un campo eléctrico muy limitado y confinado en la bicapa lipídica de la membrana celular, originando unas corrientes que se denominan corrientes de *gating* (Armstrong y Bezanilla, 1973; Armstrong, 1974).

Las proteínas transportadoras facilitan el movimiento de pequeñas moléculas a través de la membrana pero a una velocidad más lenta que la de los canales iónicos ( $10^2$ - $10^4$  moléculas/s). Dentro de este grupo se encuentran proteínas como las bombas iónicas o los cotransportadores.

### 1.1.2. El potencial de reposo

En condiciones normales, las células musculares auriculares y ventriculares y del sistema especializado de conducción presentan un  $E_m$  de aproximadamente -85 mV, mientras que en las células de los nodos SA y AV el  $E_m$  es de entre -45 y -65 mV. Las células de los nodos SA y AV y del tejido especializado de conducción presentan una propiedad conocida como “automatismo intrínseco”: son capaces de generar PA en ausencia de estímulos externos. Por el contrario, en las células musculares auriculares y ventriculares el valor del  $E_m$  se mantiene constante si la célula no es estimulada. A esta diferencia de potencial se le denomina “potencial de reposo” (PR) y está determinado por el equilibrio entre la capacidad de los distintos iones para atravesar la membrana a favor de su gradiente de concentración y el transporte activo de dichos iones en contra de su gradiente.

Si la membrana de las células cardíacas sólo fuera permeable al  $K^+$ , el  $E_m$  debería alcanzar un valor similar al del potencial de equilibrio para el  $K^+$  ( $E_K$ ). Sin embargo, el valor del  $E_m$  es menos negativo que el del  $E_K$  debido a que la membrana es además permeable a otros iones. Cuando una membrana es permeable a varios iones, el  $E_m$  depende de tres factores: la polaridad de la carga eléctrica de cada ion, la permeabilidad de la membrana ( $P$ ) a cada ion y la concentración de estos iones a ambos lados de la membrana. Por tanto, la ecuación que define el  $E_m$  en las células permeables al  $Na^+$ , al  $Cl^-$  y al  $K^+$ , denominada “ecuación de campo constante” o “ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz” (Goldman, 1943; Hodgkin y Katz, 1949), es:

$$E_m = \left( \frac{RT}{Fz} \right) \ln \left[ \frac{([K^+]_e P_K + [Na^+]_e P_{Na} + [Cl^-]_e P_{Cl})}{([K^+]_i P_K + [Na^+]_i P_{Na} + [Cl^-]_i P_{Cl})} \right] \quad (II.5)$$

donde  $P_K$ ,  $P_{Na}$  y  $P_{Cl}$  representan la permeabilidad de la membrana al  $K^+$ , al  $Na^+$  y al  $Cl^-$ , respectivamente. En esta ecuación queda representado el equilibrio entre la difusión por gradiente de concentración y la atracción eléctrica de los elementos con carga, estando la contribución de cada ion ponderada en función de su permeabilidad, de modo que si una célula es muy permeable al  $K^+$ , el término  $P_K$  dominará el valor del  $E_m$ .

### 1.1.3. El potencial de acción

Hasta este momento se ha tratado la permeabilidad relativa de cada especie iónica como una constante. Sin embargo, no es así realmente. Un aumento rápido y transitorio de la permeabilidad al  $Na^+$  provocaría que el potencial de la membrana se hiciese más positivo (el  $E_m$  se acercaría al valor

## Introducción

del  $E_{Na}$ , que es de aproximadamente +65 mV). Si a continuación aumentase de forma rápida y transitoria la permeabilidad al  $K^+$ , el potencial de membrana tendería al  $E_K$  (aproximadamente -96 mV), tal y como especifica la ecuación de Goldman. Los miocitos cardiacos, cuando reciben un estímulo de intensidad suficiente para superar el potencial umbral, generan un PA que es un estímulo “todo o nada”. La entrada de cargas positivas en la célula produce la despolarización, con lo que el interior de la célula va haciéndose más positivo (en su valor máximo, el potencial puede alcanzar valores cercanos a +40 mV), mientras que la salida de cargas positivas es responsable de la repolarización. Una vez finalizada la repolarización hay un breve periodo, denominado periodo refractario absoluto, en el que es imposible que un nuevo estímulo logre disparar un nuevo PA.

En el corazón se registran PA de diversas morfologías (Figura II.1). En las células musculares auriculares y ventriculares y en las células del sistema de His-Purkinje la despolarización es debida a la rápida entrada de iones de  $Na^+$ , mientras que en las células de los nodos SA y AV la despolarización es debida a la lenta entrada de iones de  $Ca^{2+}$ . Por lo tanto, en el corazón existen células que generan PA rápidos o “dependientes de  $Na^+$ ” y células que generan PA lentos o “dependientes de  $Ca^{2+}$ ” (Tabla II.2) (Coraboeuf y Otsuka, 1956; Beeler y Reuter, 1977; Carmeliet y Vereecke, 1979). Además, las diferentes fases del PA cardíaco se corresponden con las fases del electrocardiograma (ECG). Así, la despolarización del PA auricular se corresponde con la onda P. El intervalo PR refleja la velocidad de conducción a través del nodo AV, el complejo QRS, la despolarización y velocidad de conducción intraventriculares y el intervalo QT, la duración de la repolarización ventricular (Figura II.1). La duración del potencial de acción (DPA) es menor en las células auriculares que en las ventriculares, lo que constituye un mecanismo de protección que evita que los ventrículos puedan responder a frecuencias auriculares muy altas o a una estimulación prematura del corazón. Además, también existen diferencias en la morfología y duración de los PA de diferentes zonas del tejido auricular y ventricular, lo que ha sido atribuido tanto a la expresión de distintos tipos de canales iónicos en dichas zonas como a la distribución heterogénea de la expresión de ciertos canales (Figura II.1).

### 1.1.3.a. PA rápidos o dependientes de $Na^+$

Los PA rápidos o dependientes de  $Na^+$  presentan 5 fases (Figura II.2) (Hoffman y Cranefield, 1960; Nattel, 2002; Delpón y Tamargo, 2005).

La fase 0 de rápida despolarización de las células miocárdicas se debe a la apertura de los canales de  $Na^+$  dependientes de voltaje y, por lo tanto, a la activación de la corriente rápida de entrada de  $Na^+$  ( $I_{Na}$ ), que desplaza el potencial de membrana desde sus valores en reposo ( $PR \approx -85$

mV) hasta valores positivos ( $\approx +30$  mV). La activación de la  $I_{Na}$  es un proceso muy rápido (0.5-2 ms) y su inactivación sigue una cinética biexponencial, con un componente lento que se prolonga durante varios cientos de ms y que contribuye al mantenimiento de la fase 2 del PA. La magnitud de la  $I_{Na}$  determina la amplitud, la velocidad máxima de despolarización del PA y, por lo tanto, la velocidad de conducción intracardiaca (Hondeghe, 1978; Walton y Fozzard, 1979; Hille, 2001). A continuación, comienza la repolarización celular, en la que se distinguen 3 fases.

La fase 1 de rápida repolarización es consecuencia de la inactivación de la  $I_{Na}$  (paso del canal a una conformación no conductora) y de la activación de dos corrientes de salida de  $K^+$  dependientes de voltaje: la corriente transitoria ( $I_{to1}$ ), que se activa e inactiva rápidamente y que juega un papel fundamental en el control de la DPA sobre todo a nivel auricular y del epicardio ventricular (Boyett, 1981; Josephson y cols., 1984; Giles e Imaizumi, 1988; Shibata y cols., 1989) y el componente ultrarrápido de la corriente rectificadora tardía, de rápida activación y lenta inactivación ( $I_{Kur}$ ), que es específicamente auricular (Fedida y cols., 1993; Snyders y cols., 1993; Wang y cols., 1993).

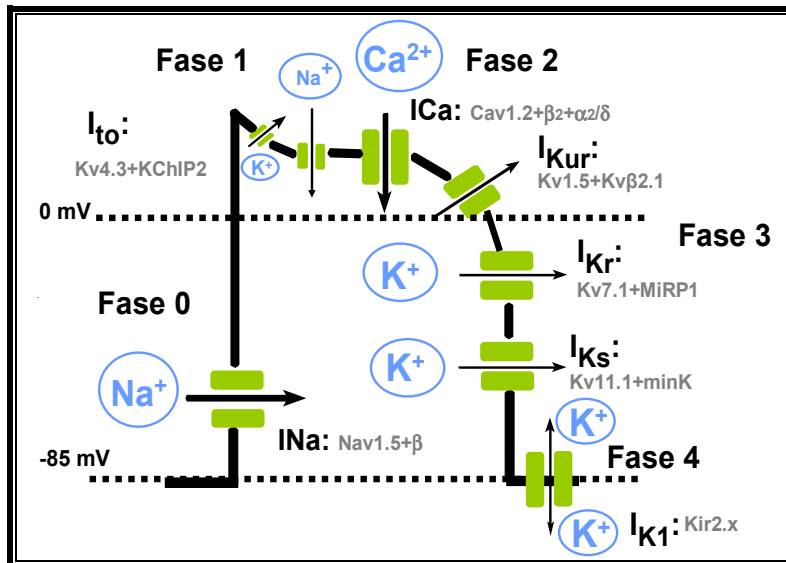
La fase 2 (o fase de meseta) representa el fino equilibrio entre dos corrientes de entrada, la  $I_{Na}$  (Rudy, 1978; Saikawa y Carmeliet, 1982; Clarkson y cols., 1984; Gintant y cols., 1984; Patlak y Ortiz, 1985) y la corriente de entrada de  $Ca^{2+}$  tipo L ( $I_{Ca,L}$ ) (Nilius y cols., 1985; Bean, 1989; Bers y Pérez-Reyes, 1999), y tres corrientes rectificadoras tardías de salida de  $K^+$  dependientes de voltaje de activación ultrarrápida ( $I_{Kur}$ ), rápida ( $I_{Kr}$ ), y lenta ( $I_{Ks}$ ) respectivamente (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990 y 1991; Wang y cols., 1993 y 1994).

Durante la fase 3, la inactivación de las corrientes de entrada provoca el predominio de las corrientes repolarizantes de  $K^+$  activadas durante la fase 2 y, como consecuencia, el  $E_m$  alcanza de nuevo el valor del PR. Además, durante la fase final de la repolarización se produce la salida de  $K^+$  a través de canales que presentan rectificación interna ( $I_{K1}$ ) (Carmeliet, 1993; Lopatin y Nichols, 2001). En las células auriculares, el sistema His-Purkinje y en los nodos SA y AV, la acetilcolina (ACh) y la adenosina se unen a sus respectivos receptores (muscarínico  $M_2$  y de adenosina  $A_1$ , ambos acoplados a proteínas G inhibitorias) activando otra corriente que presenta rectificación interna, la corriente de  $K^+$  activada por acetilcolina ( $I_{K,ACh}$ ) (Sakmann y cols., 1983). La activación de la  $I_{K,ACh}$  hiperpolariza el  $E_m$  y acorta marcadamente la DPA (Shen y Kurachi, 1995; Pelleg y Belardinelli, 1993).

La fase 4 del PA se inicia una vez que el potencial de la célula alcanza de nuevo su valor de reposo y finaliza al comienzo del siguiente PA. En las células musculares auriculares y ventriculares que no son automáticas, esta fase es isoelectrica (el  $E_m$  se mantiene constante) gracias principalmente a la  $I_{K1}$  (Carmeliet, 1993; Lopatin y Nichols, 2001; Anumonwo y Lopatin, 2009). El valor del PR depende también de la actividad de la ATPasa dependiente de  $Na^+$  y  $K^+$  y la del intercambiador

## Introducción

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  que realizan intercambios electrogénicos y contribuyen a restaurar la homeostasis intracelular tras el PA.



**Figura II.2.** PA auricular rápido o “dependiente de  $\text{Na}^+$ ”. Representación esquemática de las distintas fases del PA, con las corrientes iónicas de entrada y salida implicadas en el mismo, así como las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  que forman los canales que generan dichas corrientes.

### 1.1.3.b. PA lentos o dependientes de $\text{Ca}^{2+}$

Los PA dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  se generan en las células de los nodos SA y AV y en las células de los anillos de las válvulas mitral y tricúspide y en células anormalmente despolarizadas (PR de  $\approx -45$  mV) (Reuter, 1973; Cranefield y Aronson, 1975). A este potencial, la  $I_{\text{Na}}$  está totalmente inactivada, por lo que la fase 0 de los PA generados en estas células se debe a la lenta entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior celular a través de la  $I_{\text{Ca,L}}$ .

## 1.2. Automatismo

Aunque todas las células cardiacas son excitables y responden a los estímulos eléctricos generando PA, algunas, además, presentan actividad automática, es decir, son capaces de autoexcitarse y generar de forma espontánea PA. En condiciones fisiológicas, las células de los nodos SA y AV, de los tractos internodales auriculares y del sistema especializado de conducción His-Purkinje presentan actividad automática, careciendo de ella las fibras musculares auriculares y ventriculares (Hoffman y Cranefield, 1960). Los PA generados en estas estructuras presentan una fase 4 de lenta despolarización diastólica que desplaza el nivel del  $E_m$  hasta el nivel de potencial umbral y cuando éste se alcanza, se genera un nuevo PA propagado. La frecuencia de disparo de

una célula automática depende del potencial diastólico máximo, del nivel de potencial umbral y de la pendiente de la fase 4 de lenta despolarización diastólica.

En condiciones fisiológicas, las células del nodo SA generan PA a mayor frecuencia que las restantes células automáticas (60-80 latidos/min frente a  $\approx 15$  latidos/min), por lo que actúan como marcapasos dominante y determinan la frecuencia cardiaca, mientras que las demás células automáticas actúan como “marcapasos latentes o subsidiarios”.

### 1.3. Refractariedad

Desde hace más de 150 años se sabe que el corazón requiere cierto tiempo para recuperar la excitabilidad tras un primer estímulo, tiempo que se conoce como “periodo refractario” (Bowditch, 1871).

En las células que generan PA dependientes de  $\text{Na}^+$ , este periodo refractario viene determinado por la cinética de reactivación de la  $I_{\text{Na}}$ . Los canales de  $\text{Na}^+$  permanecen en estado de reposo durante la diástole (fase 4), se abren durante la fase 0 del PA y, a continuación, pasan a un estado inactivo no conductor (que no permite la entrada de  $\text{Na}^+$ ) en el que permanecen hasta que la repolarización alcanza valores más negativos de -50 mV. Durante el “periodo refractario absoluto”, la célula es incapaz de generar un PA y permanece inexcitable (Weidmann, 1955a; Hoffman y Cranefield, 1960; Hondeghem y Katzung, 1977). Conforme el potencial de membrana de la célula se repolariza entre -50 y -90 mV, cierta proporción de los canales de  $\text{Na}^+$  pasan del estado inactivo al estado de reposo y, por lo tanto, la aplicación de un estímulo eléctrico es capaz de generar una respuesta. Esta respuesta tendrá menor amplitud y se conducirá tanto más lentamente cuanto menor sea el tiempo transcurrido entre la aplicación del estímulo y el comienzo de la fase 0 del PA previo. En este periodo, llamado “periodo refractario efectivo”, un estímulo supraumbral puede producir una respuesta local, pero no un PA propagado (Hoffman y Cranefield, 1960). Le sigue otro periodo de tiempo durante el cual un estímulo es capaz de inducir la génesis de un PA propagado, denominado “periodo refractario relativo”. A este nivel, la  $I_{\text{Na}}$  todavía no se ha reactivado por completo, por lo que si se genera un PA prematuro, tendrá menor amplitud y menor duración que un PA generado cuando la célula se ha repolarizado y recuperado por completo su excitabilidad. Estos PA prematuros se propagan más lentamente, es decir, presentan un bajo factor de seguridad de la conducción, y el bloqueo de la misma propicia la aparición de arritmias por reentrada (Hoffman y Cranefield, 1960). La duración del periodo refractario cardiaco determina la máxima frecuencia de estimulación cardiaca y varía con la DPA. Las células auriculares presentan una menor duración del PA y del periodo refractario que las ventriculares ( $\approx 200$  ms en las primeras frente a los  $\approx 300$  ms de

las segundas), lo que explica por qué la frecuencia de las arritmias supraventriculares es mayor que la de las ventriculares. El periodo refractario, además, protege al corazón de aquellas situaciones en las que la frecuencia es muy rápida, y en las que, por tanto, se impide la relajación completa del músculo cardiaco y disminuyen su función de bomba.

#### 1.4. Propagación del impulso cardiaco

La propagación del impulso cardiaco es un fenómeno complejo que depende no sólo del tipo, tamaño, orientación y geometría de las células cardiacas, sino también de las propiedades activas y pasivas de la membrana. Las propiedades activas están determinadas por los mecanismos iónicos dependientes de voltaje y de tiempo responsables de la génesis del PA. Por otro lado, la conducción del impulso cardiaco dependerá también de los factores que determinan el PR, el acoplamiento intercelular y las propiedades de cable de la membrana (resistencia y capacitancia), esto es, de las propiedades pasivas de la membrana.

Biofísicamente, la membrana es un elemento dieléctrico que aísla dos medios conductores. Sin embargo, este aislamiento no es perfecto, ya que existen mecanismos de transporte de iones, por lo que la resistencia al paso de cargas que ofrece la membrana ante una diferencia de potencial es finita y medible. Además, el dieléctrico (en este caso, los fosfolípidos de la membrana) que aísla los medios extra e intracelular está sometido a una diferencia de potencial en la membrana, por lo que atrae cargas a las proximidades de la membrana (los aniones del citosol serán atraídos por el exterior positivo y los cationes del medio extracelular son atraídos por el interior negativo). En estas condiciones, la membrana está acumulando carga según la ecuación:

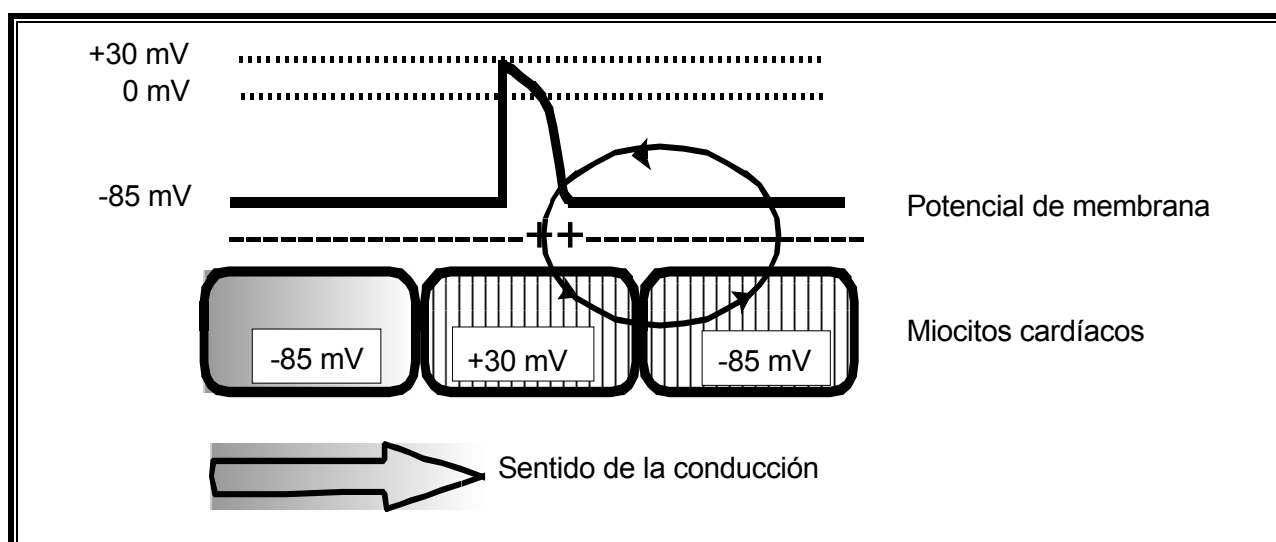
$$Q = E_m \cdot C_m \quad (\text{II.6})$$

donde  $Q$  es la carga acumulada y  $C_m$  la capacitancia de la membrana, que depende de las propiedades dieléctricas de la bicapa lipídica y de la geometría de la membrana. La  $C_m$  impone un retraso en la variación del voltaje y en la propagación del estímulo, ya que cualquier variación en el  $E_m$  debe vencer primero la carga acumulada en la membrana.

Los miocitos cardiacos están unidos entre sí por los discos intercalares (DI), que permiten el acoplamiento eléctrico, y por los desmosomas, uniones especializadas que facilitan el acoplamiento contráctil. Estas uniones permiten que el miocardio funcione como un sincitio funcional. Este acoplamiento se realiza a través de uniones de baja resistencia ( $1-3 \Omega \cdot \text{cm}^2$ , unas 700 veces menor que la de la resistencia externa de la membrana), a las que se denomina “uniones estrechas” (*gap*

*junctions*). En condiciones fisiológicas, la resistencia intracelular es mínima para un acoplamiento célula-célula que facilite la propagación sincrónica.

El impulso cardiaco se genera en el nodo SA y se propaga de forma electrotónica a las células excitables vecinas, desplazando su nivel de  $E_m$  hasta el nivel de potencial de membrana de la célula vecina ya excitada. Cuando esto sucede, se genera un nuevo PA, que a su vez despolarizará electrotónicamente las células vecinas y así sucesivamente (Figura II.3). Cuanto mayor sea la amplitud de la  $I_{Na}$  que genera el PA, mayor será la velocidad de conducción con que éste se conducirá por el miocardio y, por lo tanto, mayor será el margen de seguridad de propagación del impulso cardiaco. Por el contrario, en todas aquellas situaciones en las que la  $I_{Na}$  esté parcialmente inhibida o en aquellas células que generen PA dependientes de  $Ca^{2+}$  el margen de seguridad de propagación del impulso será menor (Delpón y Tamargo, 2005).



**Figura II.3 Representación esquemática de la propagación del impulso cardiaco.**

Una vez que los impulsos salen del nodo SA, se propagan con rapidez a toda la aurícula, produciendo la sístole auricular. A su paso a través del nodo AV, la propagación se ralentiza, lo que permite que la contracción auricular impulse la sangre hacia los ventrículos, optimizando el gasto cardiaco y reduciendo la posibilidad de que queden remanentes sanguíneos en la aurícula. Una vez atravesado el nodo AV los impulsos entran en el sistema de conducción, donde la propagación es más rápida, permitiendo finalmente la contracción ventricular coordinada.

## 2. CANALES IÓNICOS DEPENDIENTES DE VOLTAJE IMPLICADOS EN EL POTENCIAL DE ACCIÓN CARDIACO

### 2.1. Canales de Na<sup>+</sup>

Los canales de sodio dependientes de voltaje, son esenciales para el inicio (despolarización) y la propagación del PA en tejidos excitables (Ver apartado 4 para una descripción más amplia).

### 2.2. Canales de Ca<sup>2+</sup>

Los canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje permiten la entrada de Ca<sup>2+</sup> en respuesta a la despolarización de la membrana y son esenciales para acoplar las señales eléctricas en la superficie celular con la respuesta fisiológica a nivel celular (Nilius y cols., 1985; Bean, 1989). Inicialmente, los canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje se clasificaron según la magnitud de la despolarización requerida para su activación: los que requerían una fuerte despolarización (HVA, *High Voltage Activated* o *Long-lasting*) y los que requerían una despolarización menor (LVA, *Low Voltage Activated*). Los canales LVA son los que hoy en día se conocen como canales de Ca<sup>2+</sup> tipo T, que se activan rápidamente a  $E_m \approx -50$  mV y se inactivan también rápidamente (Catterall y cols., 2005b; Nerbonne y Kass, 2005). Los canales HVA se abren cuando se despolariza la membrana hasta  $\approx -30$  mV y su inactivación puede prolongarse hasta 100 milisegundos. Hasta el momento, se han identificado 5 subtipos de canales HVA (L, N, P, Q y R) que presentan diferentes propiedades cinéticas, biofísicas y farmacológicas. Sin embargo, en el miocardio humano sólo se ha demostrado la presencia de los canales de Ca<sup>2+</sup> tipo L.

Los canales tipo L presentes en los miocitos cardiacos determinan la fase de meseta del PA. Se localizan principalmente en los túbulos T, desde donde promueven la apertura de los receptores de rianodina del retículo sarcoplásmico (RyR2), con la consiguiente salida de Ca<sup>2+</sup> desde el mismo (lo que se denomina “liberación de Ca<sup>2+</sup> inducida por Ca<sup>2+</sup>”). Por su parte, los canales tipo T se localizan principalmente en las células auriculares y en las células automáticas del nodo SA y de las fibras de Purkinje, mientras que su presencia en las células ventriculares es mínima (Mitra y Morad, 1986; Yuan y cols., 1986; Hagiwara y cols., 1988; Bean, 1989). Debido a este patrón de expresión, se ha propuesto que los canales tipo T pueden participar en la regulación del automatismo cardiaco (Hagiwara y cols., 1988; Bean, 1989; Wu y Lipsius, 1990).

2.2.1. Estructura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ 

Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje son heterotetrámeros compuestos por las subunidades  $\alpha_1$ ,  $\beta$  y  $\alpha_2/\delta$ , y, en algunos tejidos, la subunidad  $\gamma$  (Bodi y cols., 2005; Catterall y cols., 2005b; Nerbonne y Kass, 2005; Rougier y Abriel, 2016). Hasta ahora, se han identificado los genes que codifican la expresión de 10 subunidades  $\alpha_1$ , 4 subunidades  $\beta$ , 4 complejos  $\alpha_2/\delta$  y 8 subunidades  $\gamma$ , aunque, a nivel cardíaco, sólo se ha demostrado la existencia de las subunidades reguladoras  $\beta$  y  $\alpha_2/\delta$ . Los diferentes tipos de corriente de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $I_{\text{Ca}}$ ) se definen en función de la subunidad  $\alpha_1$  que forma el canal, mientras que las subunidades reguladoras modulan su tráfico a membrana y/o las propiedades biofísicas de la corriente (Figura II.4) (Bodi y cols., 2005; Catterall y cols., 2005b; Nerbonne y Kass, 2005; Rougier y Abriel, 2016).

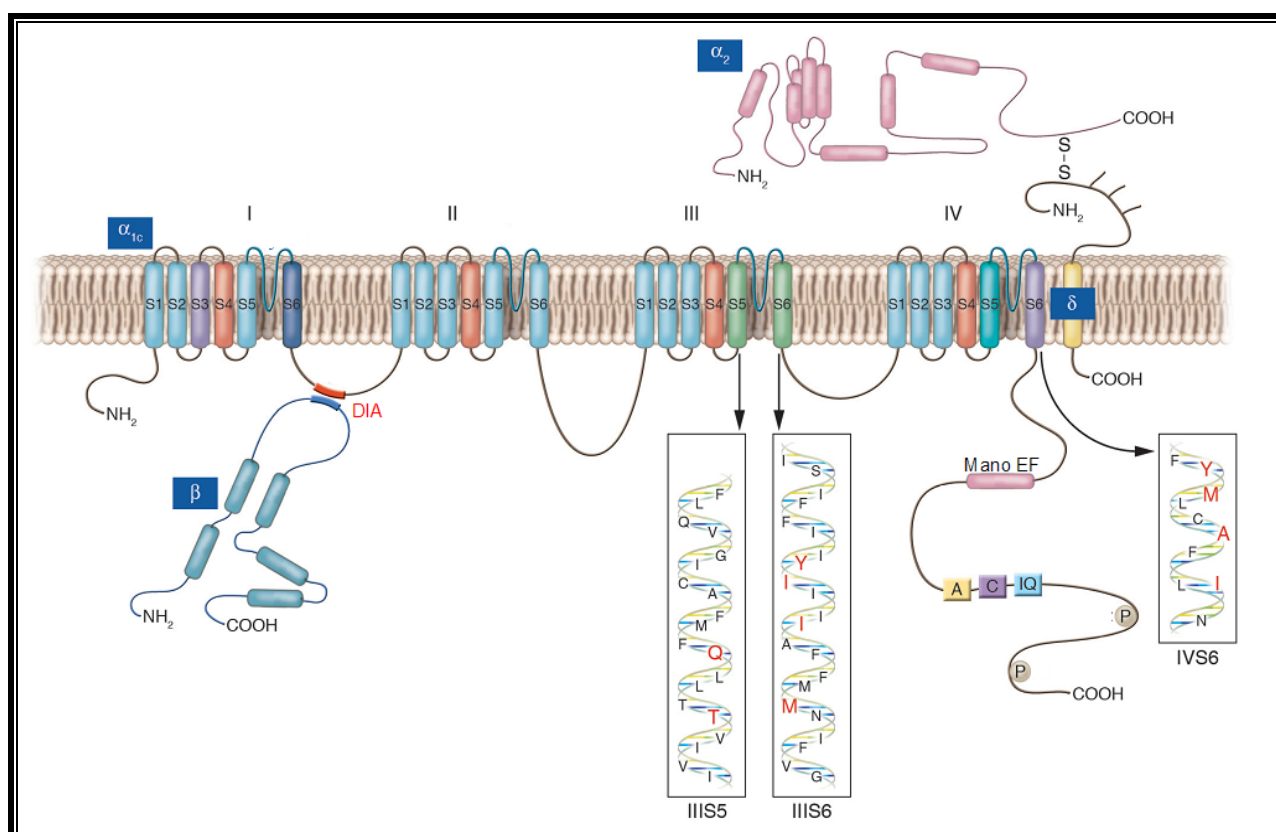


Figura II.4. Estructura del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L. [Adaptada de Bodi y cols., 2005]

- Subunidad  $\alpha$

La familia Cav1 codifica las subunidades  $\alpha_1$  de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, siendo la Cav1.2 ( $\alpha_{1C}$ ) la que se expresa predominantemente en el corazón (Bodi y cols., 2005; Zamponi y cols., 2015; Rougier y Abriel, 2016). Se han identificado tres variantes de la isoforma Cav1.2 (Cav1.2a-c), de las que la Cav1.2a es la isoforma específicamente cardíaca.

Por su parte, la familia Cav3 codifica las subunidades  $\alpha_1$  ( $\alpha_{1G}$  y  $\alpha_{1H}$ ) de los canales tipo T (Pérez-Reyes, 2003). Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  presentan una gran homología estructural con los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje. Las subunidades  $\alpha_1$  presentan 4 dominios homólogos (DI a DIV), cada uno compuesto por 6 segmentos TM en hélice- $\alpha$  (S1 a S6) (Figura II.4). El canal de  $\text{Ca}^{2+}$  presenta 4 cargas positivas en los S4 de cada dominio, dando lugar al sensor de voltaje. Estos residuos cargados están altamente conservados en todas las familias de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . También como en los canales de  $\text{Na}^+$ , el lazo P que une los S5 y S6 de los cuatro dominios se hunde en la membrana y contribuye a formar el poro del canal. Cada uno de los lazos P del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  contiene un residuo de glutámico (“locus EEEE”). Estos residuos forman una zona de alta afinidad por el  $\text{Ca}^{2+}$  (similar al locus DEKA de los canales de  $\text{Na}^+$ ) y forman el filtro de selectividad del canal (Mikala y cols., 1993; Klockner y cols., 1996; Koch y cols., 2000).

- Subunidades reguladoras

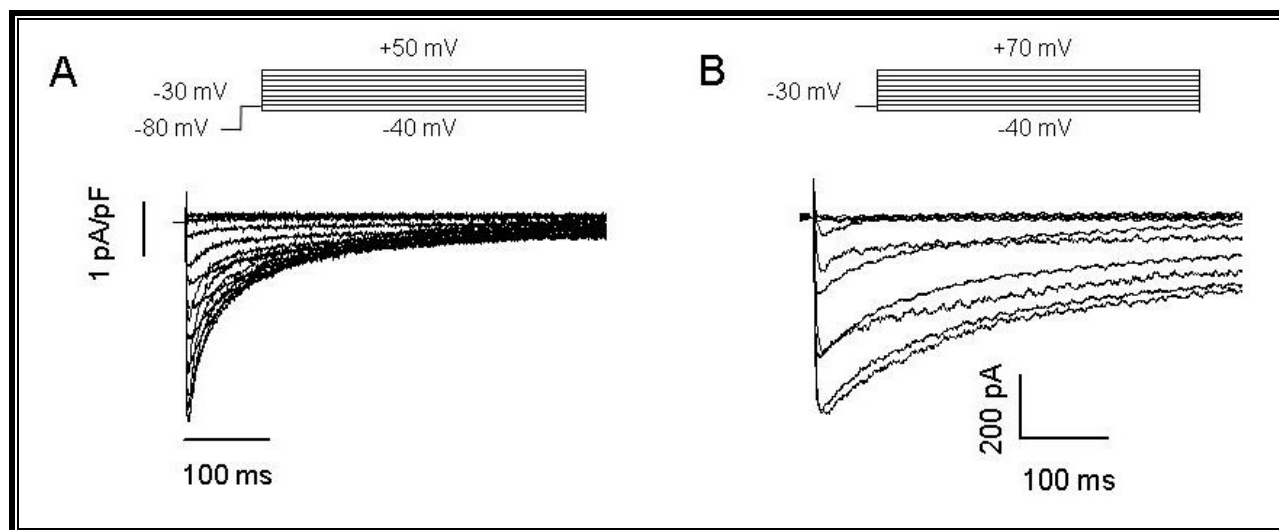
Las subunidades  $\beta$  son proteínas citosólicas que se ensamblan con las subunidades  $\alpha_1$  mediante un dominio de interacción  $\beta$  (DIB) que se une al dominio de interacción  $\alpha$  (DIA) de la subunidad  $\alpha_1$  (Figura II.4) (De Waard y cols., 1994; Pragnell y cols. 1994). Estas subunidades regulan la expresión en la membrana de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  HVA (Bichet y cols., 2000). Además, modulan las propiedades biofísicas del canal e intervienen en la regulación por el pH (Schuhmann y cols., 1997) o por receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Mikala y cols., 1998). Además, se ha descrito que las subunidades  $\beta$  podrían intervenir en el proceso de “facilitación” de la  $I_{\text{Ca,L}}$  o aumento de la amplitud de la corriente al aumentar la frecuencia de estimulación (Cens y cols., 1996). La subunidad  $\beta$  predominante en el miocardio humano es la Cav $\beta$ 2b codificada por el gen *CACNB2b* (Buraei y Yang, 2010).

- Subunidad  $\alpha_2/\delta$

El complejo  $\alpha_2/\delta$  está formado por la unión mediante un puente disulfuro de la subunidad extracelular  $\alpha_2$  y la subunidad TM  $\delta$  (Figura II.4). La función del complejo  $\alpha_2/\delta$  varía según las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta$  con las que interacciona, aunque se ha sugerido que el dominio  $\delta$  interviene en los cambios cinéticos mientras que el dominio  $\alpha_2$  es responsable del aumento de la expresión del canal en la membrana (Hofmann y cols., 1994; Mori y cols. 1996). De todas las isoformas, la que se considera predominante en el miocardio humano es la  $\alpha_2\delta_1$  codificada por el gen *CACNA2D1* (Burashnikov y cols., 2010).

2.2.2. Características de la  $I_{Ca,L}$ 

La  $I_{Ca,L}$  registrada en miocitos cardiacos presenta un potencial umbral de activación de alrededor de -30 mV y alcanza su máxima amplitud entre 0 y +10 mV. La activación y la inactivación son relativamente lentas, alcanzándose el pico máximo al cabo de 1-5 milisegundos (Figura II.5A). La inactivación de la corriente es un proceso dependiente del voltaje y de la  $[Ca^{2+}]_i$  (Kass y Sanguinetti, 1984; Lee y cols., 1985; Zhang y cols., 1994). En la inactivación dependiente de voltaje, el lazo DI-DII actúa como partícula bloqueante del canal (Kim y cols., 2004a). La inactivación debida a altas  $[Ca^{2+}]_i$  representa un mecanismo de retroalimentación negativo de gran importancia (Brehm y Eckert, 1978) en el que están implicados un motivo de unión a calmodulina (CaM) (el “motivo IQ”), un motivo en “mano EF” y los péptidos A y C que se encuentran en el extremo C-terminal del canal (Figura II.4) (Zuhlke y cols., 1999; Peterson y cols., 2000). Así, tras la despolarización y la entrada de  $Ca^{2+}$ , la  $[Ca^{2+}]_i$  aumenta hasta el rango micromolar, lo que hace que el  $Ca^{2+}$  se una a la CaM asociada al canal y se promueva la inactivación y por tanto el cese de la entrada de  $Ca^{2+}$  al miocito cardiaco. Los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L son también permeables al  $Ba^{2+}$ . De tal forma que cuando se utiliza  $Ba^{2+}$  como ión conductor en lugar de  $Ca^{2+}$ , se suprime la inactivación dependiente del aumento en la  $[Ca^{2+}]_i$  y por tanto la disminución de la corriente es menor y con una cinética más lenta (Figura II.5.B).



**Figura II.5. Características de la corriente generada por los canales de calcio tipo L. (A)**  $I_{Ca,L}$  registrada en nuestro laboratorio en miocitos auriculares humanos tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior. [Adaptada de Pérez-Hernández y cols., 2016]. **(B)** Corriente de Bario generada por los canales de Calcio tipo L registrada en nuestro laboratorio en células HL-1 tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior [Adaptada de Barana y cols., 2014]

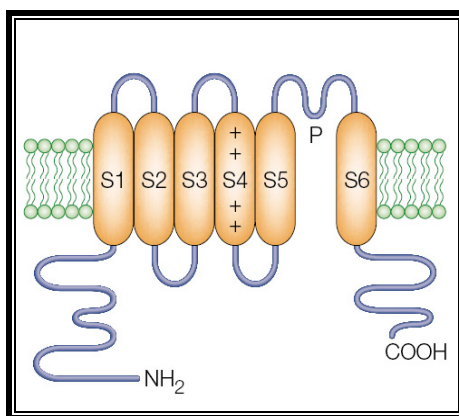
El canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L es una diana farmacológica muy importante para el tratamiento de diversas patologías. Dada la ubicuidad del  $\text{Ca}^{2+}$  como mensajero intracelular, los fármacos que inhiben la  $I_{\text{Ca,L}}$  (denominados “antagonistas del  $\text{Ca}^{2+}$ ”) están indicados en el tratamiento de la angina de pecho, hipertensión arterial (HTA), vasculopatías periféricas, algunas taquiarritmias supraventriculares y como protectores renales y cardiacos. Los antagonistas del  $\text{Ca}^{2+}$  se dividen estructuralmente en 3 grupos: las 1,4-dihidropiridinas (DHP, como el nifedipino), las bencilalquilaminas (como el verapamilo) y las benzotiazepinas (como el diltiazem). Todos ellos tienen su sitio de unión en el dominio formador del poro de la subunidad  $\alpha$  (Tikhonov y Zhorov, 2008 y 2009; Cheng y cols., 2009).

### 2.3. Canales de $\text{K}^+$ voltaje-dependientes

Los canales de  $\text{K}^+$  constituyen el grupo más heterogéneo de proteínas de membrana. Se distribuyen ubicuamente a lo largo de toda la escala filogenética y están presentes prácticamente en todas las células, donde juegan un importante papel, por ejemplo, en el mantenimiento del PR celular, la frecuencia de disparo de las células automáticas, la liberación de neurotransmisores, la secreción de insulina, la excitabilidad celular, el transporte de electrolitos por las células epiteliales o la regulación de la contracción del músculo liso esquelético y cardíaco.

A nivel cardíaco, los canales de  $\text{K}^+$  juegan un papel fundamental en el PA, ya que permiten la salida de  $\text{K}^+$  de la célula, lo que conduce a la repolarización celular. Las cinéticas de activación e inactivación de cada canal determinan su participación en el control de la excitabilidad celular: los canales que se activan rápidamente intervienen en la repolarización durante las primeras fases del PA, mientras que los canales que generan corrientes rectificadoras tardías que se activan lentamente participan fundamentalmente en la repolarización durante la fase 3. Los canales de  $\text{K}^+$  presentan una distribución heterogénea en función del tejido (aurícula frente a ventrículo) e incluso dentro de un mismo tejido (endocardio frente a epicardio). La heterogeneidad en los tipos y en la distribución de los canales de  $\text{K}^+$  determina la diferencia en la morfología de los PA de las distintas regiones del corazón (Figura II.1). Además, la expresión y las propiedades de los canales de  $\text{K}^+$  también pueden verse modificadas por fármacos, hormonas y diferentes enfermedades o patologías.

Los principales canales de  $\text{K}^+$  voltaje-dependientes que existen en el miocardio son aquellos canales formados por 6 segmentos TM y 1 poro (6TM/1P) (Figura II.6). En este grupo se incluyen los clásicos canales de  $\text{K}^+$  voltaje-dependientes cardiacos y también los canales de  $\text{K}^+$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$ , que presentan un segmento TM adicional (S0) en el extremo N-terminal.



**Figura II.6. Topología de la subunidad  $\alpha$  de los canales de  $K^+$  voltaje-dependientes presentes en el miocardio pertenecientes al grupo de canales formados por 6 segmentos TM y 1 poro (6TM/1P). [Adaptadas de Choe, 2002]**

### 2.3.1. Canales 6TM/1P

Los canales 6TM/1P agrupan a los canales de  $K^+$  activados por voltaje (canales  $K_v$ ) y a los canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  (canales  $K_{Ca}$ ).

Tras el clonaje del primer canal de  $K^+$  identificado en el mutante *Shaker* de la mosca del vinagre (Jan y cols., 1983; Papazian y cols., 1987) se identificaron otras tres subfamilias de genes que codifican la expresión de un gran número de canales  $K_v$  a las que se denominó *Shab*, *Shaw* y *Shal*. En mamíferos, estas cuatro familias se corresponden con las familias  $K_v1$  (*Shaker*),  $K_v2$  (*Shab*),  $K_v3$  (*Shaw*) y  $K_v4$  (*Shal*). Hasta la fecha, se han descrito doce familias de subunidades  $\alpha$   $K_v$  ( $K_v1$  a  $K_v12$ ), con una homología aminoacídica de  $\approx 70\%$  dentro de una misma familia y de  $\approx 40\%$  entre diferentes familias (Gutman y cols., 2005). Además, la diversidad funcional de los canales  $K_v$  se ve aumentada por factores como: a) la formación de heterotetrámeros (Christie y cols., 1990; Ruppertsberg y cols., 1990; Covarrubias y cols., 1991; MacKinnon, 1991); b) la presencia de miembros de las familias  $K_v5$ ,  $K_v6$ ,  $K_v8$  y  $K_v9$ , que no forman canales funcionales por sí solos sino que son subunidades moduladoras que se ensamblan con subunidades  $K_v2$  formando heterotetrámeros (Gutman y cols., 2005); c) la presencia de proteínas auxiliares, que modifican la función y/o la expresión en la membrana de los canales  $K_v$  (Gutman y cols., 2005); d) modificaciones postranscripcionales (*splicing* alternativo), que dan lugar a diferentes isoformas de los canales a partir de la expresión de un mismo gen (London y cols., 1997); y e) modificaciones postraduccionales, que regulan la función de muchos canales  $K_v$  mediante fosforilación, ubiquitinización, palmitoilización, nitrosilación, etc. (Grandi y cols., 2016; Chiamvimonvat y cols., 2016).

### 2.3.1.a. Estructura de los canales Kv

Los canales Kv están formados por cuatro subunidades  $\alpha$  y un número variable de subunidades auxiliares.

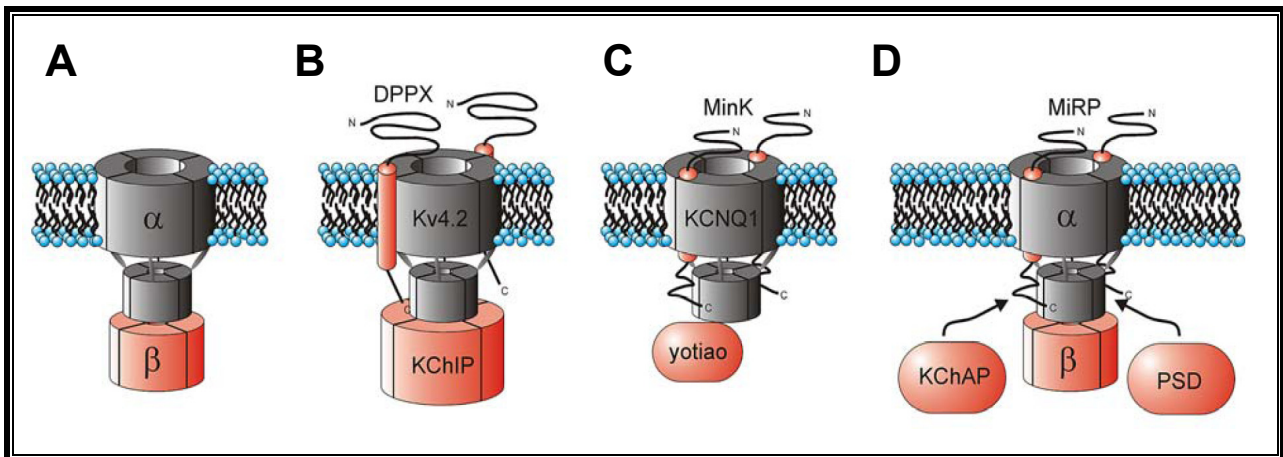
#### I. La subunidad $\alpha$

En los canales Kv, cada subunidad  $\alpha$  consta de 6 segmentos TM (S1 a S6) con estructura de hélice  $\alpha$  y conectados entre sí por secuencias hidrofílicas no conservadas (Figuras II.6A). La secuencia que conecta el S5 y el S6 se denomina región P, está formada por 20 aminoácidos, y se introduce en la membrana (1 nm) tapizando la parte extracelular del poro iónico (Liman y cols., 1991; MacKinnon, 1991; Yellen y cols., 1991; Yool y Schwarz, 1991; Whicher y cols., 2016). El poro iónico es el sitio de unión de muchas toxinas (Doyle y cols., 1998; Morais-Cabral y cols., 2001; Zhou y cols., 2001; Jiang y cols., 2002), del tetraetilamonio (TEA) (Yellen y cols., 1991; Choi y cols., 1993) y de diferentes fármacos antiarrítmicos (Yeola y cols., 1996) y anestésicos locales (Valenzuela y cols., 1995; Franqueza y cols., 1997; Caballero y cols., 2002).

Los canales Kv son capaces de detectar los cambios de voltaje producidos en la membrana y acoplar esta señal a su funcionamiento (Armstrong, 1974; Sigworth, 1994; Bezanilla, 2000 y 2002). Esta dependencia del  $E_m$  se debe a la presencia en su estructura de un “sensor de voltaje” formado por los segmentos S1 a S4 del canal. En concreto, la secuencia de cada S4 contiene cuatro o más residuos cargados positivamente (argininas y lisinas) que se recolocan en la membrana cuando el  $E_m$  varía (Liman y cols., 1991; Papazian y cols., 1991), produciendo un movimiento de cargas a través del campo eléctrico TM que se puede medir experimentalmente ( $\approx 12-13 e_0$ ) (Schoppa y cols., 1992; Hirschberg y cols., 1995) y que se denomina “corriente de *gating*” (Armstrong y Bezanilla, 1973; Armstrong, 1974)

#### II. Subunidades auxiliares

El ensamblaje de 4 subunidades  $\alpha$  es suficiente para formar un canal funcional que genere una corriente iónica. Sin embargo, la presencia de subunidades auxiliares aumenta la diversidad funcional de los canales Kv (Figura II.7) y regula funciones como el *gating* y la expresión y/o el transporte a la membrana celular de los canales. Además, estas subunidades pueden servir como sitio de unión de moléculas adaptadoras o de ligandos exógenos/endógenos.



**Figura II.7. Dibujo esquemático de diversos tipos de subunidades auxiliares de canales iónicos y su posición respecto al poro.** Las subunidades  $\alpha$  aparecen en gris y las subunidades  $\beta$  en rojo. **(A)** Ensamblaje de 4 subunidades  $\alpha$  Kv a través del extremo N-terminal con 4 subunidades  $\text{Kv}\beta$  citosólicas. **(B)** Interacción del canal Kv4.2 con un complejo de 4 subunidades citoplásmicas KChIP. Se observa también la asociación de la subunidad DPPX con la subunidad  $\alpha$ . **(C)** Asociación de 4 subunidades Kv7.1 con 2 subunidades minK, así como la formación del complejo macromolecular con la proteína adaptadora yotiao. **(D)** Complejo molecular formado por una subunidad  $\alpha$  Kv, las subunidades auxiliares  $\text{Kv}\beta$ , MiRP y KChAP y una proteína de densidad pos-sináptica (PSD). [Adaptadas de McCrossan y Abbott, 2004]

- Subunidades  $\text{Kv}\beta$

La familia de las subunidades  $\text{Kv}\beta$  está compuesta por tres proteínas homólogas ( $\text{Kv}\beta 1$  a  $\text{Kv}\beta 3$ ), así como varias isoformas de alguna de ellas (Wang y cols., 1996; Martens y cols., 1999). Son proteínas citosólicas que se ensamblan a la subunidad  $\alpha$  por el extremo N-terminal y su principal efecto es inducir una rápida inactivación de la corriente (especialmente las  $\text{Kv}\beta 1$ ), aunque también se ha descrito una función tipo chaperona que podría promover o estabilizar la expresión de los canales en la membrana (Figuras II.7A y D) (Nakahira y cols., 1996; Martens y cols., 1999; Wissmann y cols., 1999).

- Subunidad minK y péptidos relacionados

Hasta la fecha se han descrito 5 proteínas codificadas por genes de la familia KCNE ( $\text{KCNE}1$  a  $\text{KCNE}5$ ). Todas ellas presentan un único segmento TM, un dominio N-terminal extracelular y un dominio C-terminal intracelular (McCrossan y Abbott, 2004; Bendahhou y cols., 2005).

La proteína minK (*minimal  $K^+$  channel subunit*) fue la primera en ser identificada (Takumi y cols., 1988; Murai y cols., 1989). Las siguientes subunidades auxiliares codificadas por genes KCNE se identificaron por homología con minK y se denominaron MiRP (*MinK-Related Peptides*) (Figura II.7D) (Abbott y cols., 1999; McCrossan y Abbott, 2004).

- Subunidad KChAP

La subunidad KChAP ( $K^+$  Channel-Associated Protein) pertenece a la familia de proteínas inhibidoras del STAT activado (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) (Wible y cols., 1998). Estas proteínas interactúan con una gran variedad de factores de transcripción e intervienen en procesos como la apoptosis (Wible y cols., 2002).

La subunidad KChAP es una proteína citoplásmica que puede unirse al extremo N-terminal de las subunidades  $\alpha$  Kv1, Kv2 y Kv4 (Figura II.7D) (Wible y cols., 1998; Kuryshev y cols., 2000).

- Subunidades KChIP

Las subunidades auxiliares KChIP (*Kv Channel Interacting Protein*) son proteínas citosólicas de las que se han identificado cuatro tipos (KChIP1 a KChIP4) y diversas isoformas de varias de ellas. Estas subunidades se unen al extremo N-terminal de las subunidades  $\alpha$  con una estequiometría 1:1 (Figura II.7B) (Kim y cols., 2004b).

La mayoría de las proteínas KChIP modifican la actividad del canal afectando a la cinética de inactivación y/o de recuperación de la inactivación (An y cols., 2000; Decher y cols., 2001; Patel y cols., 2002; Wang y cols., 2007).

- Subunidades DPPX

Las proteínas dipeptidilpeptidasas (DPP) pertenecen a la familia de serina-proteasas no clásicas y son glicoproteínas de membrana con un largo extremo C-terminal extracelular (Wada y cols., 1992).

El primer miembro identificado de esta familia fue la proteína DPP6 (Figura II.7B), del que se ha sugerido que tiene como función regular la cinética y el tráfico a la membrana de los canales Kv4 (Kin y cols., 2001; Nadal y cols., 2003; Radicke y cols., 2008), con los que interacciona siguiendo una estequiometría 1:1 (Soh y Goldstein, 2008).

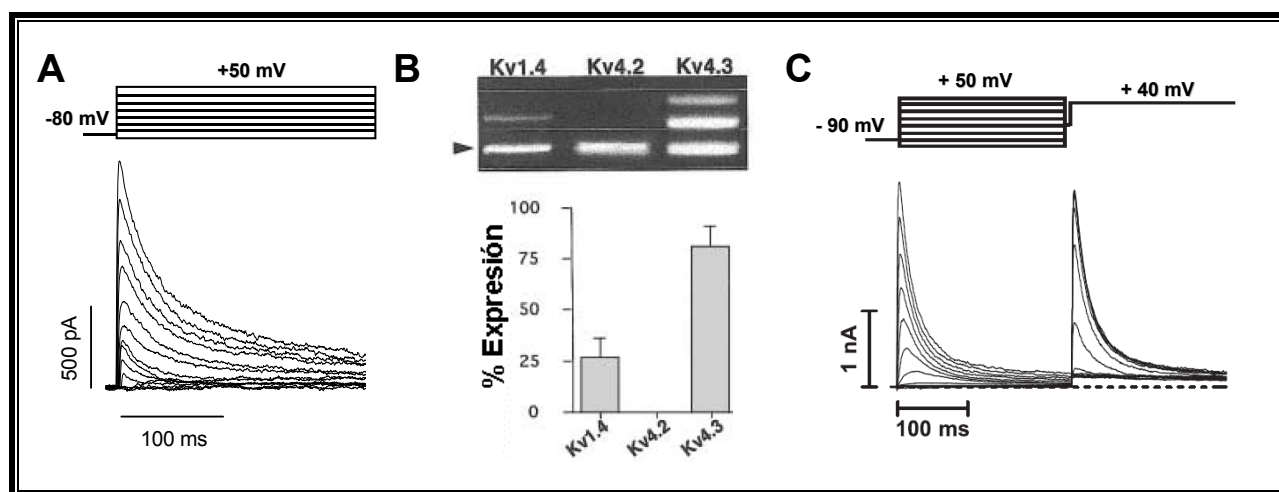
### 2.3.1.b. Principales corrientes generadas a través de canales Kv que intervienen en el PA cardiaco

Gracias a estudios realizados con la técnica de *patch-clamp* en miocitos auriculares y ventriculares, se han podido identificar las corrientes de  $K^+$  generadas a través de canales Kv implicadas en el PA cardiaco, que son: la  $I_{to1}$ , la  $I_{Kur}$ , la  $I_{Kr}$  y la  $I_{Ks}$ .

I. La  $I_{to1}$ 

La corriente transitoria está formada en realidad por dos componentes bien diferenciados, la  $I_{to1}$  y la  $I_{to2}$ , donde sólo la  $I_{to1}$  es una corriente de  $K^+$ , ya que la  $I_{to2}$  es una corriente de  $Cl^-$  activada por  $Ca^{2+}$  (Siegelbaum y cols., 1977; Kenyon y Gibbons, 1979; Coraboeuf y Carmeliet, 1982; Hiraoka y Kawano, 1989). A su vez, existen dos fenotipos de  $I_{to1}$ : una  $I_{to1}$  lenta ( $I_{to1,s}$ ) y una  $I_{to1}$  rápida ( $I_{to1,f}$ ). Ambos fenotipos se pueden distinguir en función de sus propiedades biofísicas, moleculares y farmacológicas (Nerbonne y Kass, 2005; Chiamvimonvat y cols., 2016). En cualquier caso la  $I_{to1}$  es responsable de la rápida repolarización del PA durante la fase 1, por lo que determina la altura y la duración de la fase de meseta (Nerbonne, 2000; Oudit y cols., 2001; Tamargo y cols., 2004; Niwa y Nerbonne, 2010).

La  $I_{to1}$  se activa (alcanza su máxima amplitud en 5-20 milisegundos) e inactiva rápidamente (Figura II.8), siendo su reactivación también muy rápida ( $\approx 50$  milisegundos) (Litovsky y Antzelevitch, 1988; Fermini y cols., 1992). La amplitud de la  $I_{to1}$  es dependiente de la frecuencia cardiaca, por lo que su papel en la DPA es más importante a frecuencias cardiacas lentas.



**Figura II.8. Características de la  $I_{to1}$ .** (A)  $I_{to1}$  registrada en miocitos auriculares humanos en nuestro laboratorio tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior de la figura. (B) Detección por PCR de los distintos tipos de canales que generan la  $I_{to1}$  auricular humana (panel superior) y representación de la expresión relativa de su ARNm (panel inferior). En el panel superior, la flecha corresponde a la banda de control interno. (C) Corriente generada por canales Kv4.3 registrada en células CHO tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior. [Adaptadas de Gómez y cols., 2008 (A), Bertaso y cols., 2002 (B) y Caballero y cols., 2004 (C)]

En el miocardio humano (Escande y cols., 1987; Beuckelmann y cols., 1993; Näbauer y cols., 1993; Varro y cols., 1993; Wettwer y cols., 1993), la densidad de la  $I_{to1}$  es  $\approx 6$  veces mayor en el tejido auricular y en las fibras de Purkinje que en el ventrículo, mientras que dentro de éste, la  $I_{to1}$

## Introducción

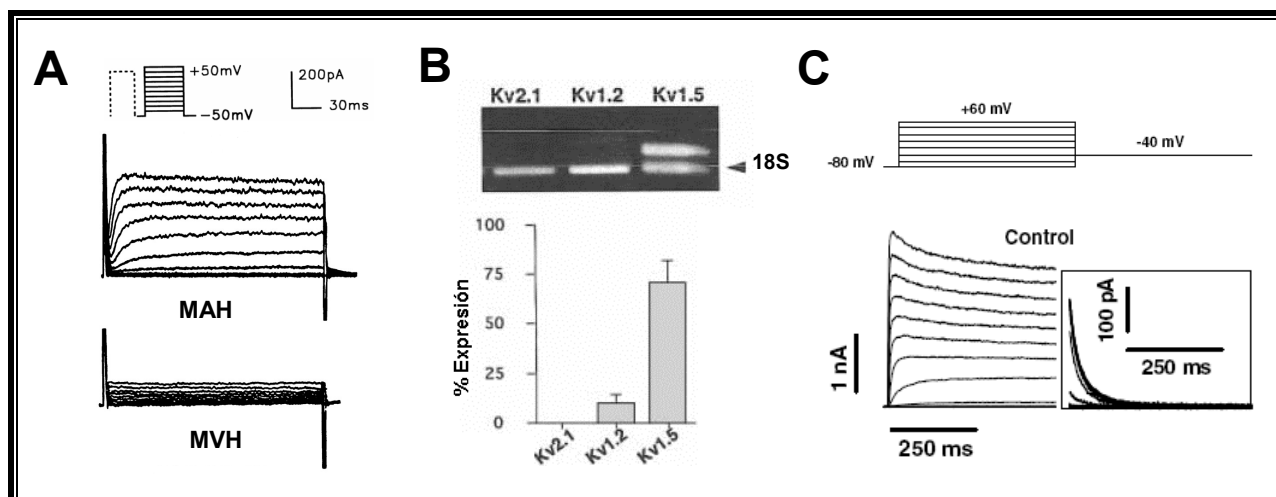
presenta un gradiente transmural de expresión (epicardio > células M > endocardio, siendo  $\approx 3-4$  veces mayor en el epicardio que en el endocardio) (Wettwer y cols., 1994; Näbauer y cols. 1996; Li y cols., 1998). Además, se observa un patrón de expresión para los dos fenotipos de la  $I_{to1}$  según la región del miocardio que se estudia: la  $I_{to1,s}$  se expresa fundamentalmente en regiones que presentan una DPA más prolongada (endocardio, ventrículo izquierdo, septo y ápex), mientras que la  $I_{to1,f}$  se expresa mayoritariamente en regiones epicárdicas, ventrículo derecho y en la base del corazón (Oudit y cols., 2001; Tamargo y cols., 2004; Niwa y Nerbonne, 2010).

Se ha propuesto que los canales que generan la  $I_{to1,s}$  están formados por tetrámeros de subunidades Kv1.4 (Oudit y cols., 2001; Tamargo y cols., 2004; Niwa y Nerbonne, 2010) posiblemente asociadas a subunidades Kv $\beta$ 1 y/o Kv $\beta$ 2 (Morales y cols., 1995; Serodio y cols., 1996). Por el contrario los canales que generan en el miocardio humano la  $I_{to1,f}$  están formados por subunidades Kv4.3 (Dixon y cols., 1996; Kong y cols., 1998; Dilks y cols., 1999). En este caso diversas subunidades auxiliares parecen formar parte del canalosoma que genera la  $I_{to1,f}$  incluyendo las subunidades KCHIP2 (Bähring y cols., 2001; Kuo y cols., 2001; Rosati y cols., 2001), MiRP1 y MiRP2 (Zhang y cols., 2001; Deschênes y Tomaselli, 2002; Lundby y Olesen, 2006; Radicke y cols., 2006; Delpón y cols., 2008) y DPP6 (Radicke S y cols., 2008).

## II. La $I_{Kur}$

Las células auriculares humanas, pero no las ventriculares (Figura II.9A) (Wang y cols., 1993; Li y cols., 1996b), presentan una corriente de salida de  $K^+$  denominada  $I_{Kur}$  que se activa en el rango de potenciales de la fase de meseta del PA (Snyders y cols., 1993; Wang y cols., 1993; Amos y cols., 1996; Feng y cols., 1998a). Su exclusiva presencia auricular contribuye a que la DPA en este tejido sea más breve que en el ventricular (Feng y cols., 1998b; Tamargo y cols., 2009) y la convierte en una posible diana terapéutica para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de arritmias auriculares (Brendel y Peukert, 2002; Nattel, 2002; Tamargo y cols., 2009).

La  $I_{Kur}$  se activa rápidamente ( $< 10$  milisegundos) y su inactivación, dada la lentitud del proceso, se considera mínima en condiciones fisiológicas (Figura II.9) (Apkon y Nerbonne, 1991; Wang y cols., 1993; Li y cols., 1996b; Tamargo y cols., 2004; Caballero y cols., 2010b). Sin embargo, la recuperación de la inactivación también es muy lenta, lo que tiene gran importancia para explicar la dependencia de frecuencia de esta corriente a potenciales de membrana fisiológicos (Feng y cols., 1998a y 1998b).



**Figura II.9. Características de la  $I_{Kur}$ .** (A)  $I_{Kur}$  registrada en miocitos auriculares humanos (MAH) tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior. Tras aplicar el mismo protocolo en miocitos ventriculares humanos (MVH), la  $I_{Kur}$  no aparece. (B) Detección por PCR de canales Kv que generan corrientes tipo  $I_{Kur}$  en muestras auriculares humanas (panel superior) y representación de la expresión relativa del ARNm de cada uno (panel inferior). En el panel superior, la flecha corresponde a la banda del control interno. (C) Corriente generada por canales Kv1.5 humanos expresados en células *Ltk* tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior de la figura. [Adaptadas de Li y cols., 1996b (A), Bertaso y cols., 2002 (B) y Gómez y cols., 2005 (C)]

La  $I_{Kur}$  humana es generada por tetrámeros de subunidades Kv1.5 asociados a subunidades Kv $\beta$ 1 (Nattel y cols., 1999). Curiosamente la proteína Kv1.5 se expresa en igual proporción en aurícula y en ventrículo humano, aunque sólo genera canales funcionales en la aurícula (Fedida y cols., 1993; Wang y cols., 1993; Li y cols., 1996b).

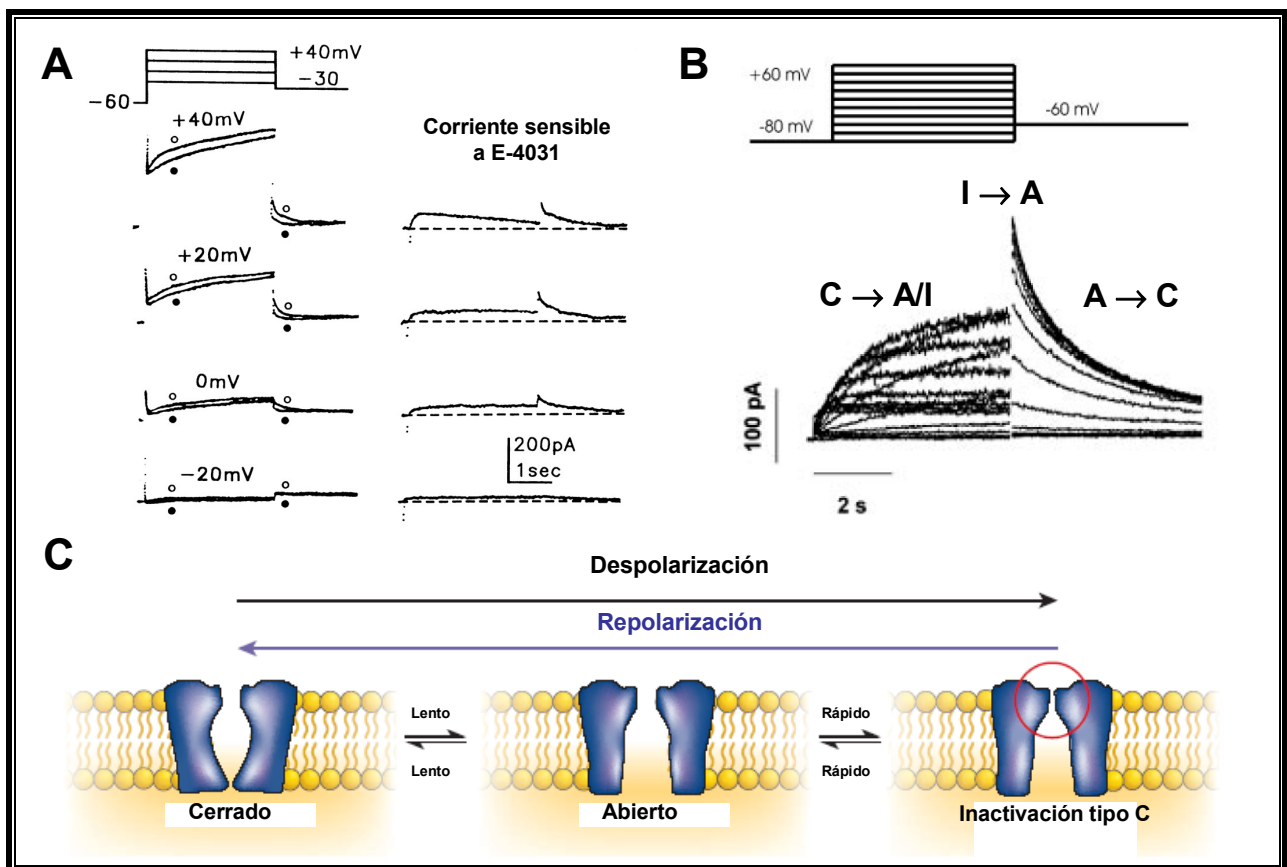
### III. La $I_{Kr}$

El componente rápido de la corriente de salida de  $K^+$  con rectificación tardía contribuye a la fase 3 de la repolarización y juega un importante papel en el control de la DPA y del periodo refractario (Hancox y cols., 1998; Zhou y cols., 1998; Tseng, 2001; Tamargo y cols., 2004).

La importancia de la  $I_{Kr}$  se ha puesto de manifiesto gracias a diferentes patologías en las que se producen mutaciones tanto en la subunidad  $\alpha$  (Sanguinetti y cols., 1995 y 1996a) como en las subunidades  $\beta$  (Abbott y cols., 1999), que se pueden manifestar como SQTL congénitos o adquiridos (Splawski y cols., 2000; Tamargo, 2000) y que se han relacionado con un aumento del riesgo de sufrir arritmias. Además, la  $I_{Kr}$  es la diana terapéutica de los antiarrítmicos de clase III (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990; Spector y cols., 1996a; Nattel y Singh, 1999).

III.a. Características de la  $I_{Kr}$

Con la despolarización del  $E_m$ , la amplitud de la  $I_{Kr}$  va aumentando progresivamente hasta alcanzar un máximo a potenciales entre 0 y +10 mV. A potenciales más positivos, la amplitud disminuye debido a que la inactivación del canal tiene lugar más rápidamente que la activación (Figura II.10) (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990; Li y cols., 1996a; Spector y cols., 1996b; Smith y cols., 1996; Hancox y cols., 1998; Tseng, 2001; Caballero y cols., 2003; Amorós y cols., 2011; Caballero y cols., 2017). Sin embargo, cuando la repolarización alcanza valores de  $E_m$  negativos (en la fase 3 del PA), los canales que generan la  $I_{Kr}$  se recuperan rápidamente de la inactivación y vuelven a entrar en el estado abierto (la velocidad de recuperación de la inactivación a través del estado abierto es más rápida que la de deactivación), lo que da lugar a una corriente de gran tamaño que facilita la repolarización final del PA (Figura II.10) (Hancox y cols., 1998; Zhou y cols., 1998;



**Figura II.10. Características de la  $I_{Kr}$ .** (A) Corriente registrada en miocitos ventriculares humanos en ausencia (○) y en presencia (●) de E-4031 tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior (a la izquierda) y componente sensible al E-4031 (la  $I_{Kr}$ , a la derecha). (B) Registro de la corriente generada por subunidades Kv11.1 registrada en células CHO tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior. Se muestran las transiciones entre las diferentes conformaciones del canal (A: Activo. C: Cerrado. I: Inactivo). (C) Representación esquemática de los distintos estados del canal Kv11.1. [Adaptadas de Li y cols., 1996a (A), Caballero y cols., 2003 (B) y Sanguinetti y Tristani-Firouzi, 2006 (C)]

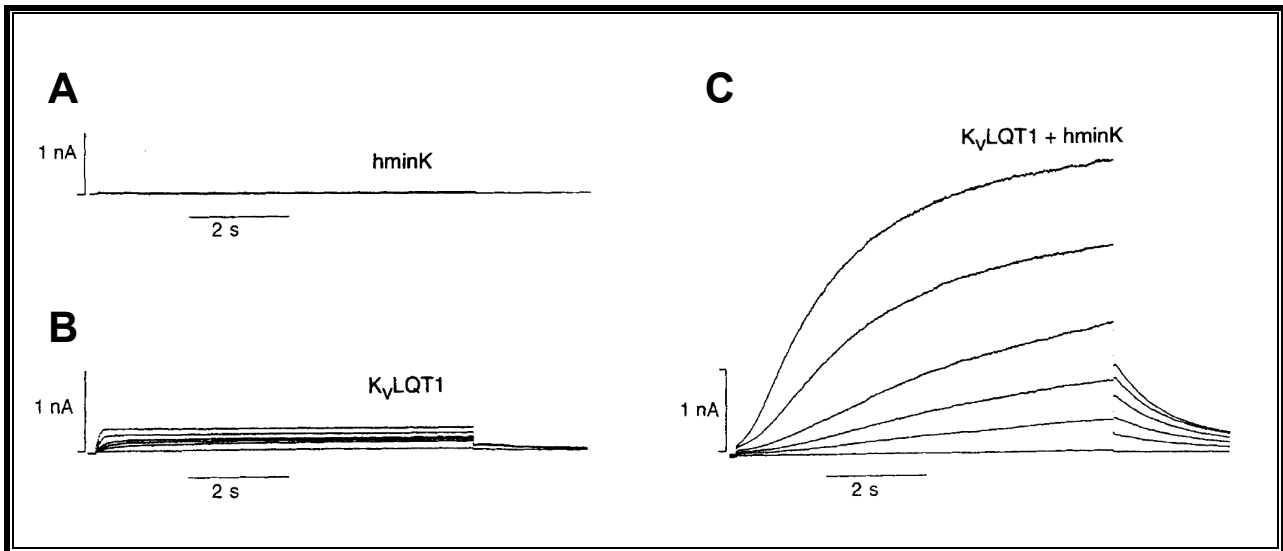
Tseng, 2001). Por todo ello, el grado de activación de la  $I_{Kr}$  durante la fase 2 viene determinado por la dependencia de voltaje y de tiempo de la activación de los canales, mientras que en la fase 3 su participación está determinada por la recuperación de la inactivación y la deactivación de los mismos (Tseng, 2001). Tanto las características biofísicas como la distribución de los canales que generan la  $I_{Kr}$  son específicas de cada especie. Así, la densidad de la  $I_{Kr}$  en el miocardio humano es mayor en el ventrículo que en la aurícula, mientras que en la rata y el cobayo ocurre lo contrario (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1991; Pond y cols., 2000; Tseng, 2001; Tamargo y cols., 2004).

### *III.b. Composición de los canales que generan la $I_{Kr}$*

La  $I_{Kr}$  es generada por tetrámeros de la subunidad  $\alpha$  Kv11.1 (antiguamente denominada hERG, *human ether-à-go-go related gene*) (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990 y 1991) de la cual existen, al menos, dos isoformas debidas a modificaciones postranscripcionales en su extremo N-terminal (hERG1a y hERG1b) con diferentes propiedades biofísicas (London y cols., 1997; Wang y cols., 2000). Se acepta que ambas isoformas se ensamblan en el miocardio para formar un canal heterotetramérico (Jones y cols., 2004). Existen datos experimentales que sugieren que las subunidades minK (codificada por *KCNE1*) y, principalmente, MiRP1 (*KCNE2*) forman parte de los canales que generan la  $I_{Kr}$ , sin embargo, la estequiometría de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  y su posible distribución tejido-específica en el miocardio humano no ha sido identificada todavía. Algunos autores sugieren que MiRP1 se expresa exclusivamente en las fibras de Purkinje y en las células marcapaso (Pourrier y cols., 2003; Nawathe y cols., 2013), y no en las células auriculares o ventriculares, lo que pone en duda el papel de esta subunidad en la formación de los canales que generan la  $I_{Kr}$ .

### *IV. La $I_{Ks}$*

El componente lento de la corriente de salida de  $K^+$  con rectificación tardía participa fundamentalmente en la fase 3 de los PA auriculares y ventriculares (Delpón y cols., 1995; Jespersen y cols., 2005; Tamargo y cols., 2004; Caballero y cols., 2010). La importancia de la  $I_{Ks}$  en la repolarización se pone de manifiesto porque las mutaciones en los genes que codifican los canales que generan esta corriente están relacionadas con la aparición de diversos síndromes arritmogénicos (SQTL, SQTC, FA).



**Figura II.11. Características de la  $I_{Ks}$ .** (A-C) Corrientes registradas en células de mamífero transfectadas sólo con las subunidades minK (A) y Kv7.1 (B) o con ambas subunidades a la vez (C). [Adaptadas de Sanguinetti y cols., 1996b]

#### IV.a. Características de la $I_{Ks}$

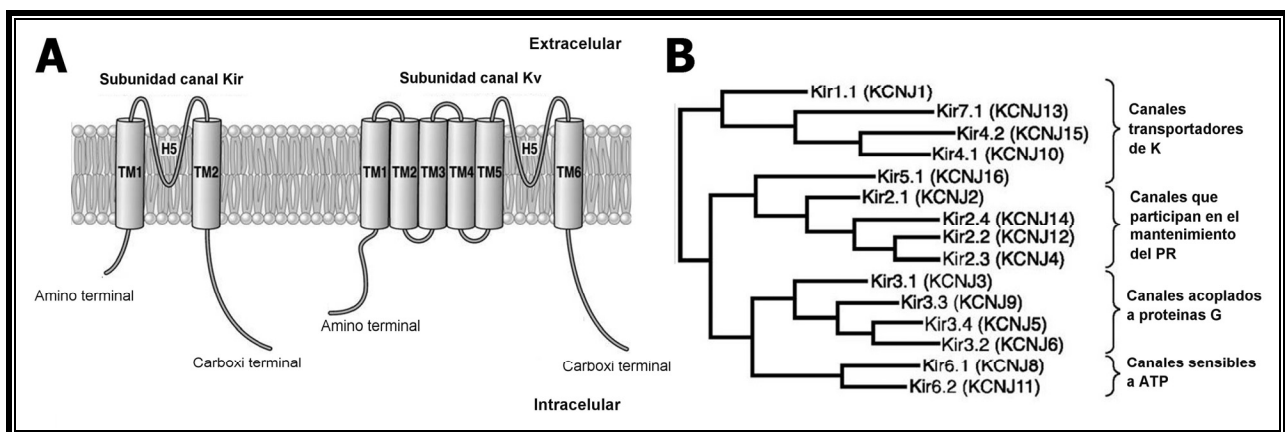
La  $I_{Ks}$  se activa a potenciales más positivos de -30 mV, alcanza la mitad de su activación máxima a +20 mV y presenta una amplitud hasta 10 veces mayor que la de la  $I_{Kr}$  cuando su activación es máxima (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990; Kurokawa y cols., 2001). La cinética de activación de la  $I_{Ks}$  es muy lenta y su amplitud máxima en estado estable sólo se alcanza con despolarizaciones extremadamente largas (Mitcheson y Sanguinetti, 1999), mientras que su cinética de deactivación es muy lenta y dependiente de voltaje (Virag y cols., 2001). La  $I_{Ks}$  es la principal responsable del control de la DPA ventricular a frecuencias rápidas, ya que, al aumentar la frecuencia cardíaca, los canales que generan la  $I_{Ks}$  tienen menos tiempo para desactivarse y se acumulan en el estado abierto, propiciando una repolarización más rápida y el acortamiento de la DPA (Jurkiewicz y Sanguinetti, 1993; Delpón y cols., 1995).

#### IV.b. Composición de los canales que generan la $I_{Ks}$

Cuatro subunidades  $\alpha$  Kv7.1 (antiguamente denominada KvLQT1) se ensamblan a través del dominio C-terminal con dos subunidades auxiliares minK para generar una corriente que se activa lentamente y cuyas características se corresponden con la  $I_{Ks}$  nativa (Figura II.11C) (Barhanin y cols., 1996; Sanguinetti y cols., 1996b; Chen y cols., 2003a; Schmitt y cols., 2000). Sin embargo cada una de las subunidades por separado no genera corrientes similares a las registradas en las células nativas (Figura II.11C).

### 3. CANALES QUE GENERAN CORRIENTES CON RECTIFICACIÓN INTERNA

Los canales de  $K^+$  rectificadores internos (Kir) presentan una estructura 2TM/1P, es decir, están formados por la asociación de 4 subunidades  $\alpha$ , que constan únicamente dos segmentos TM que se encuentran tapizando el poro iónico. Estos canales desempeñan varias funciones importantes como el control de la señalización neuronal, el PR y la frecuencia cardiaca o la liberación de insulina. Desde un punto de vista evolutivo, los canales 2TM/1P son los más antiguos y su estructura recuerda a los S5 y S6 de los canales Kv (Figura II.12A). Sin embargo, los canales Kir carecen de un dominio sensor de voltaje equivalente al de los canales Kv (S1 a S4), lo que concuerda con los estudios electrofisiológicos que demuestran que la conductancia de los canales Kir depende de la diferencia entre el  $E_m$  y el  $E_K$ , y no sólo del  $E_m$ .



**Figura II.12. Estructura básica y árbol filogenético de los canales Kir.** (A) Estructura primaria de una subunidad de canales Kir (*izquierda*). Cada subunidad Kir contiene dos regiones TM (TM1 y TM2), un loop formador del poro (H5), y un  $NH_2$  y  $COOH$  terminal citosólico. Para permitir la comparación se muestra a la *derecha* la estructura de una subunidad de canales Kv (B) Análisis filogenético y de la secuencia de aminoácidos de 15 subunidades conocidas de canales Kir humanos. Estas subunidades pueden ser clasificadas en 4 grupos funcionales [*Adaptadas de Hibino y cols., 2010*]

#### 3.1. Una familia de canales de $K^+$ con rectificación interna

En 1949, Bernard Katz (Katz, 1949) identificó la presencia en las fibras de músculo esquelético una nueva corriente de  $K^+$  cuya amplitud aumentaba a potenciales más negativos del  $E_K$  y disminuía con potenciales despolarizantes.

En los años siguientes, se demostró la presencia de corrientes con características similares (“rectificadoras internas” ver más adelante) en el músculo cardiaco de diferentes especies (Weidmann, 1955; Hutter y Noble, 1960; Rougier y cols., 1968; Mascher y Peper, 1969; Beeler y Reuter, 1970) y se describieron las principales características de esta rectificación interna. Pero no

fue hasta los años 90, con el auge de las técnicas de biología molecular, cuando se consiguieron clonar los primeros canales que generaban este tipo de corrientes (Ho y cols., 1993; Kubo y cols., 1993a y 1993b) y describir los mecanismos moleculares de la rectificación interna (Fakler y cols., 1994; Ficker y cols., 1994; Lopatin y cols., 1994; Fakler y cols., 1995).

| Familia             | Corriente   | Proteína   | Gen    | Cromosoma     | Localización                                  |
|---------------------|-------------|------------|--------|---------------|---|
| <b>Kir1 (ROMK)</b>  |             | Kir1.1-1.3 | KCNJ1  | 17q25         | Riñón, corazón, páncreas                      |
| <b>Kir2 (IRK)</b>   | $I_{K1}$    | Kir2.1     | KCNJ2  | 17q23.1-24.2  | Corazón, SNC, ME, ML, pulmón, placenta, riñón |
|                     | $I_{K1}$    | Kir2.2     | KCNJ12 | 17p11.1       | Corazón                                       |
|                     | $I_{K1}$    | Kir2.3     | KCNJ4  | 22q13.10      | Corazón, SNC, ME                              |
|                     |             | Kir2.4     | KCNJ14 | 19q13.1-13.3  | Corazón, SNC, retina                          |
|                     |             | Kir2.5     | -      | -             | Corazón ( <i>Carassius carassius</i> )        |
|                     |             | Kir2.6     | KCNJ18 | 17p11.2       | ME  |
| <b>Kir3 (GIRK)</b>  | $I_{K,ACh}$ | Kir3.1     | KCNJ3  | 2q24.1        | Corazón, cerebelo                             |
|                     |             | Kir3.2     | KCNJ6  | 21q22.13-22.2 | Corazón, páncreas                             |
|                     |             | Kir3.3     | KCNJ9  | 1q21-23       | SNC   |
|                     | $I_{K,ACh}$ | Kir3.4     | KCNJ5  | 11q24         | Corazón, páncreas                             |
| <b>Kir4 (BIR10)</b> |             | Kir4.1     | KCNJ10 | 1q22-q2       | Glía  |
|                     |             | Kir4.2     | KCNJ15 | 21q22.2       | Riñón, pulmón, SNC                            |
| <b>Kir5</b>         |             | Kir5.1     | KCNJ16 | 17q23.1-24.2  | SNC, SNP                                      |
| <b>Kir6</b>         | $I_{K,ATP}$ | Kir6.1     | KCNJ8  | 12p11.23      | Heterogénea                                   |
|                     | $I_{K,ATP}$ | Kir6.2     | KCNJ11 | 11p15.1       | Heterogénea                                   |
| <b>Kir7</b>         |             | Kir7.1     | KCNJ13 | 2q37          | SNC, riñón, tiroides                          |

**Tabla II.2. Familias de canales de  $K^+$  2TM/1P en mamíferos.** ME: Músculo esquelético. ML: Músculo liso. SNC: Sistema nervioso central. SNP: Sistema nervioso periférico.

Tras el clonaje de los primeros canales Kir (Ho y cols., 1993; Kubo y cols., 1993a y 1993b), se han identificado muchas más proteínas pertenecientes a esta familia de canales. Además, se ha unificado la nomenclatura de los genes que codifican las proteínas que forman los canales Kir, que han sido nombrados como KCNJ. Actualmente, la familia de canales Kir se compone de 7 subfamilias (Kir1 a Kir7) (Tabla II.2), con distintas propiedades, diferente distribución y más o menos bien definidas funciones fisiológicas para cada una de ellas (Kubo y cols., 2005). Las proteínas Kir presentan entre 327 y 501 aminoácidos y una homología estructural de entre un 30 y un 40%, mientras que dentro de cada subfamilia el grado de homología llega a alcanzar el 60%.

Los canales Kir se pueden dividir en 4 grupos: los canales que participan en el mantenimiento del PR (Kir2), los canales acoplados a proteínas G (Kir3), los canales sensibles a ATP (Kir6) y los canales transportadores de  $K^+$  (Kir1, Kir4 y Kir7) (Figura II.12B).

En el corazón, hay tres corrientes con rectificación interna. La principal de ellas es la  $I_{K1}$  cuya densidad es mayor en el ventrículo que en la aurícula. Por el contrario, la  $I_{K,ACH}$ , una corriente activada por la estimulación del receptor muscarínico  $M_2$ , presenta mayor densidad en el tejido auricular que en el ventricular. La  $I_{K,ACH}$  también está, presente en los nodos AV y SA, donde juega un papel muy importante en la regulación vagal de la frecuencia cardiaca. La tercera corriente es la regulada por las concentraciones intracelulares de ATP y ADP ( $I_{K,ATP}$ ) (Lopatin y Nichols, 2001; Anumonwo y Lopatin, 2010).

### 3.2. Principales corrientes cardiacas generadas a través de canales Kir

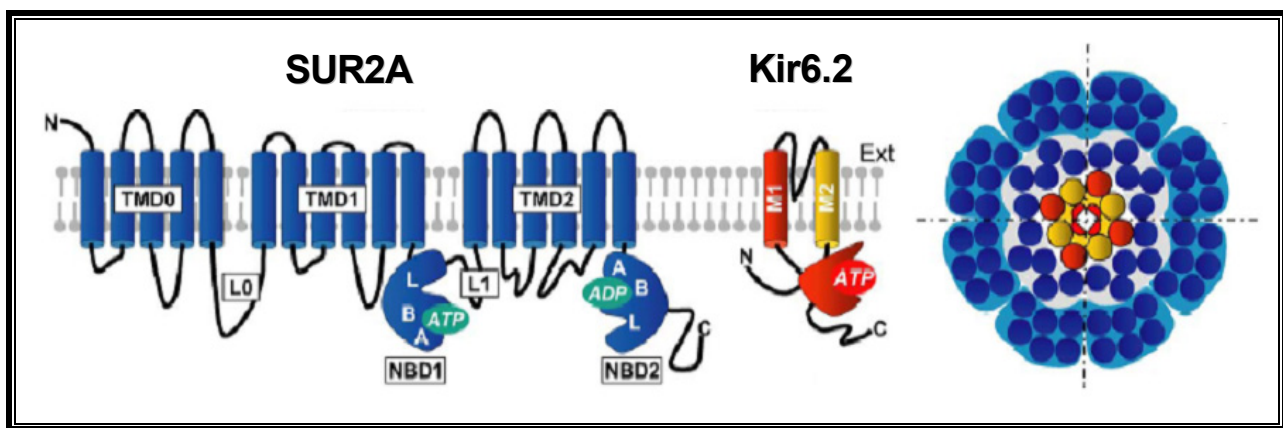
Dentro de la familia de canales Kir, las subfamilias Kir2, Kir3 y Kir6 son las que se expresan en el tejido cardiaco: los canales Kir2 participan en la formación de los canales que generan la  $I_{K1}$  (Lopatin y Nichols, 2001; Anumonwo y Lopatin, 2010), las subunidades Kir3.1 y Kir3.4 (pertenecientes al grupo de canales acoplados a proteínas G) forman el canal que genera la  $I_{K,ACH}$ , responsable de los efectos cronotrópicos e inotrópicos negativos observados tras la estimulación vagal (Yamada y cols., 1998; Stanfield y cols., 2002), y las subunidades Kir6 heteromerizan con el receptor de sulfonilureas (SUR) para formar los canales que generan la corriente sensible a ATP ( $I_{K,ATP}$ ), responsable del acortamiento de la DPA que ocurre durante la isquemia (Nichols y cols., 1996; Seino y Miki, 2003). En este apartado 3.2 describiremos la  $I_{K,ATP}$  y la  $I_{K,ACH}$  y en el siguiente apartado (3.3) detallaremos la  $I_{K1}$ .

#### 3.2.1. La $I_{K,ATP}$

##### 3.2.1.a. Características de la $I_{K,ATP}$ y composición de los canales que la generan.

El canal  $K_{ATP}$  ventricular es el resultado de la asociación de 4 subunidades  $\alpha$  Kir6.2 con 4 subunidades auxiliares SUR2A (Yokoshiki y cols., 1998; Seino y Miki, 2003; Foster y Coetzee, 2016), mientras que en la aurícula parece que podrían asociarse subunidades Kir6.2 también a subunidades SUR1 (Nichols y cols., 2013; Foster y Coetzee, 2016). Se ha descrito, que en el sistema de conducción los canales  $K_{ATP}$  podrían estar formados también por subunidades Kir6.1 (Bao y cols., 2011). Las subunidades  $\alpha$  Kir6 están formadas por 2 segmentos TM (M1 y M2) y son las que confieren al canal la capacidad de ser regulado por el ATP (Tucker y cols., 1996). Las subunidades auxiliares SUR2A tienen 3 dominios TM (TMD0, TMD1 y TMD2) y 2 dominios de

unión a nucleótidos, NBD1 y NBD2 (*Nucleotide Binding Domain*), localizados en el lazo de unión entre TMD1 y TMD2 y en la región C-terminal, respectivamente (Figura II.13) (Conti y cols., 2001; Seino y Miki, 2003). Estas subunidades son las que confieren al canal la sensibilidad al ADP, a las sulfonilureas y a los “activadores” del canal (Yokoshiki y cols., 1998; Moreau y cols., 2000; Seino y Miki, 2003; Foster y Coetzee, 2016). La hidrólisis del ATP en los dominios NBD de las subunidades SUR2A produce la activación del canal y permite el paso de  $K^+$  a través de la subunidad  $\alpha$  Kir6.2 (Yokoshiki y cols., 1998; Seino y Miki, 2003).



**Figura II.13. Estructura de los canales  $K_{ATP}$ .** Modelo estructural del canal  $K_{ATP}$  cardíaco formado por 4 subunidades Kir6.2 (en rojo y amarillo) y 4 subunidades SUR2A (en azul). Cada subunidad Kir6.2 está formada por 2 segmentos TM en  $\alpha$ -hélice y un largo dominio citoplásmico con el sitio de unión para el ATP. Cada subunidad SUR2A contiene 3 dominios TM (TMD0, TMD1 y TMD2) y 2 dominios de unión a nucleótidos (NBD1 y NBD2) localizados en el lazo de unión entre TMD1 y TMD2 (L1) y en el extremo C-terminal. [Adaptada de Moreau y cols., 2005]

### 3.2.1.b. Regulación de la $I_{K,ATP}$

Los canales  $K_{ATP}$  permiten acoplar el  $E_m$  al metabolismo celular (Yokoshiki y cols., 1998; Seino y Miki, 2003; Foster y Coetzee, 2016) puesto que los canales son regulados por el cociente ATP/adenosín difosfato (ADP). La  $I_{K,ATP}$  se inhibe cuando aumenta el ATP intracelular, mientras que se activa por el ADP (Yellen, 2002). Sin embargo, diversos factores como otros nucleótidos difosfato, el lactato o algunos radicales libres derivados del  $O_2$  pueden producir la desensibilización del canal, es decir, la pérdida de su capacidad para ser regulado por el ATP (Yokoshiki y cols., 1998; Seino y Miki, 2003; Foster y Coetzee, 2016). Además, al igual que en los canales Kir2.1, el canal  $K_{ATP}$  está regulado por el  $PIP_2$  y otros lípidos de membrana. El  $PIP_2$  interactúa directamente con dos residuos arginina del extremo C-terminal de la subunidad Kir6.2 (R176 y R177), estabilizando el estado abierto del canal y antagonizando la inhibición producida por el ATP (Fan y Makielski, 1997; Lopatin y Nichols, 2001). En el mecanismo de rectificación de la  $I_{K,ATP}$

intervienen  $Mg^{2+}$  y  $Na^+$  intracelular (Horie y cols., 1987) además de las poliaminas que bloquean el canal de forma dependiente del pH (Baukrowitz y cols., 1999).

### 3.2.2. La $I_{K,ACh}$

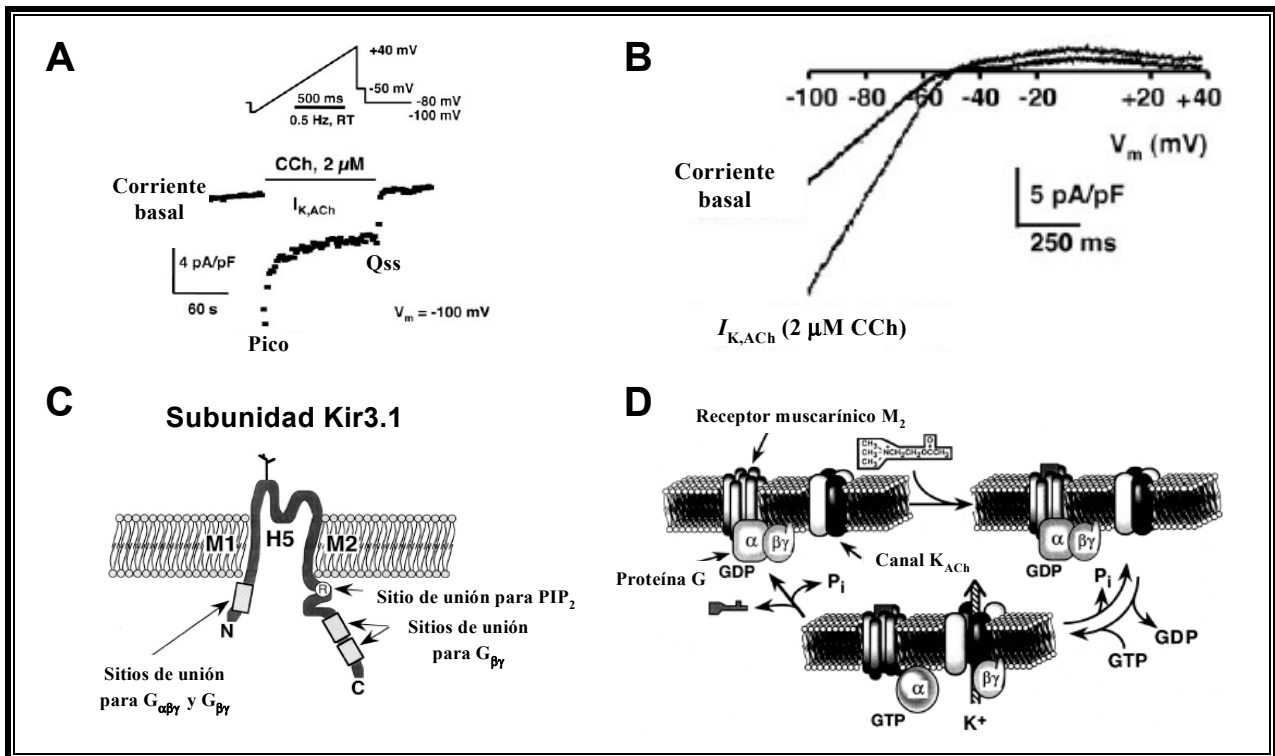
A principios del siglo XX, Otto Loewi describió que la liberación de ACh producida tras la estimulación vagal disminuía la frecuencia cardíaca (Loewi, 1921; Loewi y Navaratil, 1926). Posteriormente, el grupo del Prof. Trautwein analizó la cinética de la  $I_K$  inducida por ACh en el nodo SA de conejo y propusieron que la ACh activaba una población específica de canales (a los que llamaron  $K_{ACh}$ ) que retrasaba la actividad marcapasos del nodo SA (Noma y Trautwein, 1978; Osterrieder y cols., 1981).

#### 3.2.2.a. Características de la $I_{K,ACh}$

La densidad de los canales  $K_{ACh}$  es muy alta en las células marcapaso de los nodos SA (donde regula la frecuencia cardíaca) y AV (Mark y Herlitze, 2000). Además, juega un papel importante en el control de la DPA en el tejido auricular, donde la densidad de la  $I_{K,ACh}$  es 6 veces mayor que en el ventricular (Schram y cols., 2002).

La ACh estimula los receptores muscarínicos  $M_2$  y produce la apertura de los canales  $K_{ACh}$  que generan una corriente que se caracteriza principalmente por una activación de cinética sigmoideal dependiente de tiempo y de la dosis de agonista, por lo que se tardan cientos de milisegundos en alcanzar la amplitud máxima de la corriente (Breitwieser y Szabo, 1988). Posteriormente, y aunque la ACh esté todavía presente, se produce la disminución gradual de la corriente hasta que se alcanza un nivel cercano al estado estable, denominado “*quasi-steady-state*” (Qss) (Figura II.14A y B) (Kurachi y cols., 1987).

La apertura de los canales  $K_{ACh}$  inducida tras la estimulación del receptor  $M_2$  está mediada por una proteína G. La estimulación del receptor produce la disociación del complejo  $G_\alpha$ -GDP, lo que permite la formación del complejo  $G_\alpha$ -GTP que, a su vez, promueve la disociación del dímero  $G_{\beta\gamma}$  de la subunidad  $G_\alpha$ . El dímero  $G_{\beta\gamma}$  es la molécula que interactúa con el canal promoviendo su activación (Figura II.14C y D) (Yamada y cols., 1998).



**Figura II.14. Características de la  $I_{K,ACh}$  y estructura de los canales  $K_{ACh}$ .** (A) Curso temporal de la  $I_{K,ACh}$  inducida por el agonista de receptores muscarínicos carbacol (CCh). Tras la estimulación con CCh se alcanza un pico de corriente cuya amplitud disminuye como consecuencia de la rápida desensibilización alcanzándose un nivel de corriente denominado “quasi-steady-state” (Qss). (B) Curva I-V en situación control y tras la aplicación de CCh. (C) Esquema representativo de la estructura de la subunidad Kir3.1, formada por 2 segmentos TM (M1 y M2) cuyos extremos N- y C-terminal son intracelulares y que están unidos entre si por el lazo H5. Se indican los sitios de unión de proteínas G y de  $PIP_2$ . (D) Representación esquemática del proceso de activación del canal  $K_{ACh}$  por proteínas G en respuesta a la activación del receptor muscarínico  $M_2$  tras la unión de ACh. [Adaptadas de Dobrev y cols., 2005 (A-B) y Yamada y cols., 1998 (C-D)]

La activación de la  $I_{K,ACh}$  hiperpolariza el  $E_m$  y reduce la frecuencia de disparo de las células del nodo SA, lo que explica su efecto cronotrópico negativo. Además, reduce la frecuencia de disparo y la velocidad de conducción a través del nodo AV, lo que explica por qué la estimulación vagal puede parar las taquiarritmias por reentrada intranodal (Snyders, 1999; Tamargo y cols., 2004).

### 3.2.2.b. Composición de los canales que generan la $I_{K,ACh}$

En el corazón humano, los canales que generan la  $I_{K,ACh}$  están formados por el ensamblaje de subunidades Kir3.1 y Kir3.4, que forman una estructura tetrámerica siguiendo una estequiometría 2:2 (Dascal y cols., 1993; Krapivinsky y cols., 1995; Yamada y cols., 1998), mientras que la presencia de Kir3.2 y Kir3.3 es mínima o incluso nula (Wickman y cols., 1998). Se ha postulado que la subunidad Kir3.1 requiere de la presencia de la subunidad Kir3.4 para formar el canal funcional (Kennedy y cols., 1996; Yamada y cols., 1998). De hecho, se ha demostrado que los

ratones Kir3.4<sup>-/-</sup> presentan una disminución de proteína Kir3.1 y una total ausencia de la  $I_{K,ACH}$  en el corazón (Wickman y cols., 1998). Las regiones N- y C-terminales de la subunidad Kir3.1 son las responsables de la unión del dímero  $G_{\beta\gamma}$  al canal, aunque se ha propuesto que el extremo N-terminal de la subunidad Kir3.4 también participa en esta unión (Huang y cols., 1995; Tucker y cols., 1996).

### 3.2.2.c. Regulación de la $I_{K,ACH}$

La  $I_{K,ACH}$  es estimulada por el ATP intracelular, el  $PIP_2$  y por agonistas de los receptores  $\mu$ -opioides,  $\alpha_2$ -adrenérgicos, de adenosina A1 (esto explica el porqué la administración intravenosa de adenosina se utiliza para detener las taquiarritmias por reentrada intranodal) y de endotelina  $ET_A$  e inhibida por la distensión de la membrana (dependiente de la subunidad Kir3.4) y la acidificación del medio intracelular (Ji y cols., 1998; Shieh y cols., 2000; Tamargo y cols., 2004).

La inhibición farmacológica de la  $I_{K,ACH}$  puede ser directa (flecainida y propafenona) o indirecta vía los receptores muscarínicos  $M_2$  (isopiramida, procainamida, quinidina o verapamilo) (Ito y cols., 1989; Inomata y cols., 1993). Tanto el  $Ba^{2+}$  como el  $Cs^+$  aplicados extracelularmente inhiben la  $I_{K,ACH}$  de manera dependiente de voltaje (Carmeliet y Mubagwa, 1986).

## 3.3. La $I_{K1}$

Hace más de 50 años, cuando la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos estaba apenas empezando a desarrollarse, uno de sus pioneros, Silvio Weidmann (Weidmann, 1955b), demostró que en las fibras de Purkinje del corazón de oveja existía una corriente rectificadora interna (denominada posteriormente  $I_{K1}$ ) similar a la que Bernard Katz había descrito en músculo esquelético en 1949 (Katz, 1949). Posteriormente se describieron corrientes con propiedades de rectificador interno en trabéculas y músculos papilares de ventrículo de perro (Mascher y Peper, 1969; Beeler y Reuter, 1970), así como en tejido auricular (Rougier y cols., 1968). Estos primeros estudios describían también el papel de la  $I_{K1}$  en el mantenimiento del PR de los miocitos cardiacos (Hutter y Noble, 1960; Hall y cols., 1963; Noble, 1965; McAllister y Noble, 1966).

### 3.3.1. La rectificación interna en los canales Kir

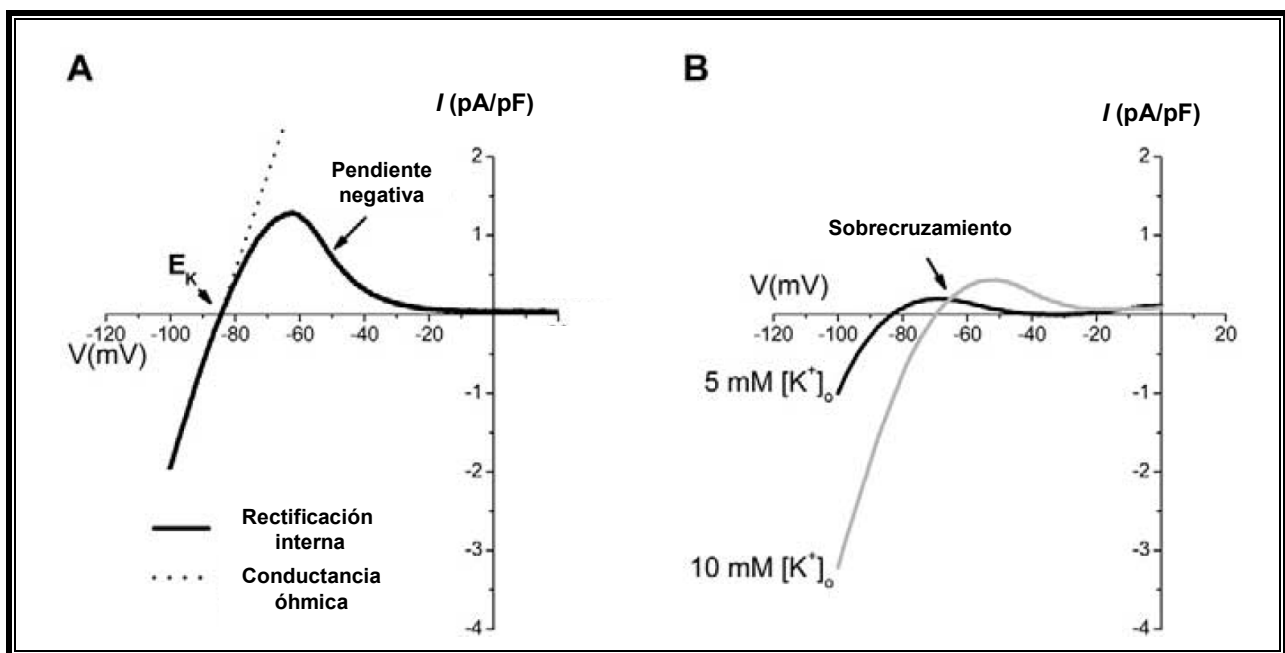
Los canales iónicos se pueden considerar como resistencias eléctricas situadas en la membrana plasmática que pasan cargas en forma de iones entre dos compartimentos (los medios intra y

## Introducción

extracelular). Dada una resistencia la relación entre la intensidad de la corriente y el voltaje es lineal y se describe mediante la ley de Ohm (conductancia óhmica):

$$\text{Intensidad} = \text{Voltaje} / \text{Resistencia} \quad (\text{II.7})$$

Las corrientes que presentan rectificación interna no tienen una relación I-V lineal puesto que en un rango de voltaje de entre -60 y -20 mV (dependiendo del canal y las concentraciones de  $K^+$  intra y extracelulares) se produce una reducción muy marcada de la amplitud de la corriente (“pendiente



**Figura II.15. Características de la rectificación interna en la  $I_{K1}$ .** (A) Relación I-V de la corriente  $I_{K1}$ . Se muestra el  $E_K$  y la corriente esperada si el comportamiento del canal siguiese la ley de Ohm (línea punteada). (B) Efectos de la  $[K^+]_o$  sobre la  $I_{K1}$ . [Adaptadas de Dhamoon y Jalife, 2005]

negativa”) (Figura II.15A). A potenciales más positivos de -20 mV la amplitud de la corriente se mantiene en valores mínimos). Como resultado los canales de  $K^+$  que presentan rectificación interna generan una corriente de entrada de gran amplitud a potenciales más negativos del  $E_K$ , mientras que a potenciales más positivos generan una corriente de salida de amplitud mucho menor (Figura II.13).

Atendiendo a la intensidad de la rectificación interna podemos dividir los canales  $K_{ir}$  como “muy rectificadores” (*strong inward rectifiers*) o “poco rectificadores”. Los rectificadores fuertes presentan una “pendiente negativa” y generan corrientes similares a las originalmente descritas por Katz en músculo esquelético (Katz, 1949). Sólo los canales  $K_{ir2}$  y  $K_{ir3}$  se ajustan a la definición de

canales muy rectificadores, mientras que el resto (Kir1 y Kir4 a Kir7) son poco rectificadores (Lopatin y Nichols, 2001; Anumonwo y Lopatin, 2010).

Otra propiedad exclusiva de estas corrientes es que la rectificación interna presenta dependencia de la  $[K^+]_e$ . En concreto, un aumento de la  $[K^+]_e$  produce una despolarización del  $E_K$ , un aumento de la probabilidad de apertura y el desplazamiento hacia potenciales más positivos de la relación I-V (en paralelo al desplazamiento del  $E_K$ ), dando lugar a un fenómeno de “sobrecruzamiento” (*crossover*) entre las relaciones I-V obtenidas para cada una de las diferentes  $[K^+]_e$  (Figura II.15B). Una importante consecuencia de este fenómeno es que la amplitud de la corriente aumenta a potenciales más positivos del punto de “sobrecruzamiento” en lugar de disminuir, como sería de esperar debido a la reducción de la fuerza electromotriz que se produce al aumentar la  $[K^+]_e$  (Figura II.15B).

### 3.3.1.a. Mecanismos moleculares de la rectificación interna

Hace 40 años, Clay Armstrong sugirió que la rectificación interna podría deberse al bloqueo dependiente de voltaje del poro iónico por una molécula cargada positivamente, y que la disociación de este bloqueante de su sitio de unión al canal por el  $K^+$  extracelular explicaría la anómala dependencia de la  $[K^+]_e$  que presenta la corriente de salida (Armstrong, 1969). A finales de los años 80, se demostró que el  $Mg^{2+}$  intracelular puede ocasionar la rectificación interna de la  $I_{K1}$  en miocitos ventriculares a través del bloqueo del poro del canal (Matsuda y cols., 1987; Vanderberg, 1987), aunque el bloqueo voltaje-dependiente producido por el  $Mg^{2+}$  no era suficiente como para explicar la rectificación interna (Oliva y cols., 1990; Martin y cols., 1995). A partir de entonces, diversos trabajos demostraron que las propiedades básicas de la rectificación interna se podían explicar por el potente bloqueo dependiente de voltaje producido por una familia de cationes orgánicos intracelulares denominados poliaminas (espermina, espermidina y putrescina) (Fakler y cols., 1994; Ficker y cols., 1994; Lopatin y cols., 1994; Fakler y cols., 1995).

Las poliaminas están presentes en todos los tipos celulares y sus concentraciones intracelulares alcanzan el rango milimolar bajo (Cohen, 1998). Sin embargo, sólo las poliaminas libres originan la rectificación de los canales Kir (Yan y cols., 2005) y la mayoría de las poliaminas se encuentran unidas a diferentes moléculas intracelulares como el ADN, el ARN o el ATP (Watanabe y cols., 1991). Entre las poliaminas, la espermina (tetraivalente) es la más potente a la hora de ocasionar rectificación interna, seguida de la espermidina (trivalente) y la putrescina (divalente) y la

cadaverina (divalente) (Figura II.16C) (Lopatin y cols., 1994; Baronas y cols., 2014). De acuerdo por tanto con el conocimiento actual, la rectificación interna es consecuencia de la entrada de poliaminas y  $Mg^{2+}$  en el interior del poro iónico que son repelidos desde interior celular por la despolarización. Por el contrario la hiperpolarización del interior celular atrae a las poliaminas y el  $Mg^{2+}$  lo que produce su disociación de sus sitios de unión en el poro.

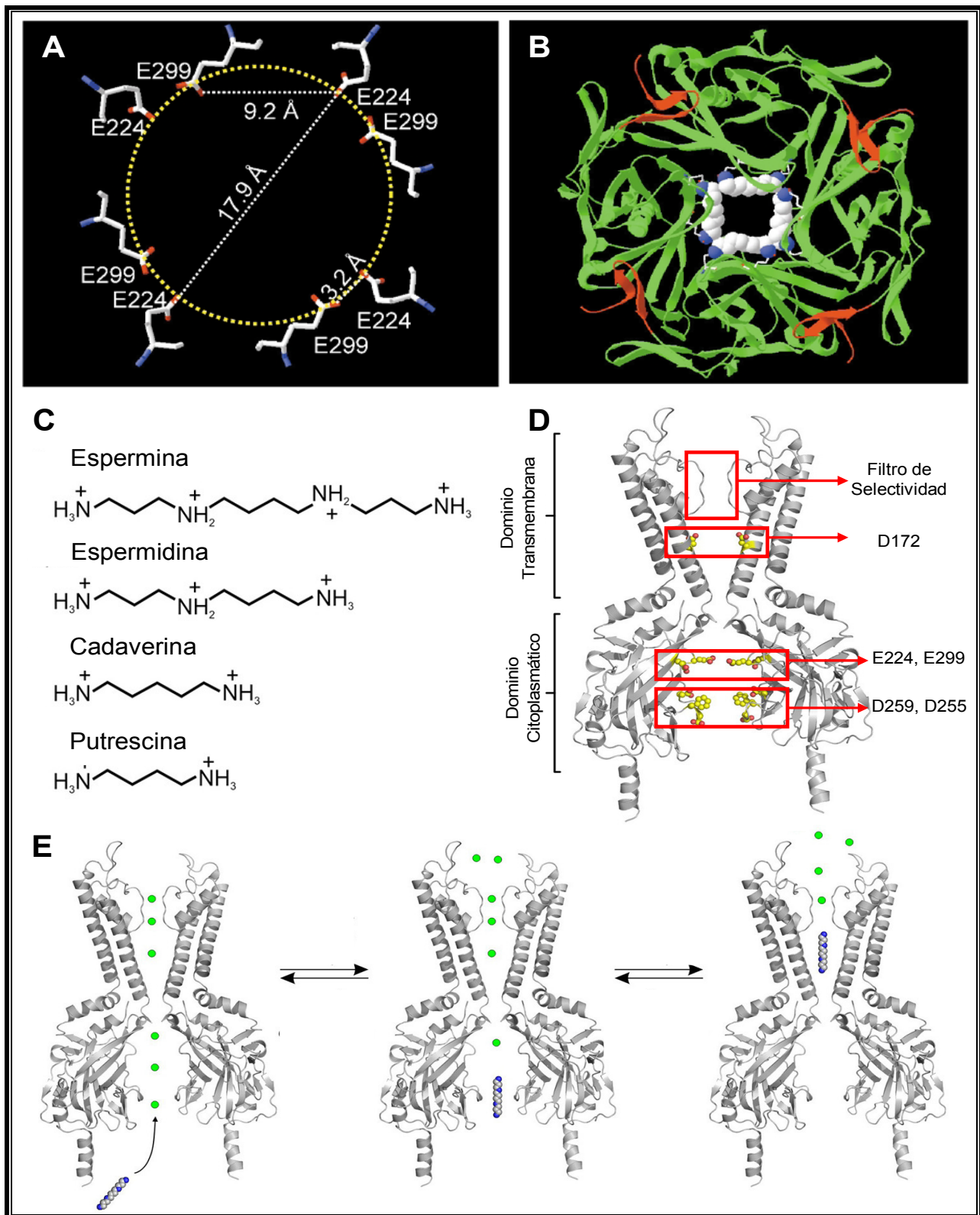
### 3.3.1.b. Determinantes moleculares de la rectificación interna

Se han identificado varios aminoácidos que resultan críticos en la rectificación de los canales Kir. Entre ellos destacan un ácido aspártico localizado en el M2 a la altura de la cavidad hidrófila (correspondiente al D172 en la subunidad Kir2.1) (Lu y MacKinnon, 1994; Stanfield y cols., 1994; Yang y cols., 1995a) y dos ácidos glutámicos localizados en la porción citoplásmica (correspondientes a los residuos E224 y E299 en la subunidad Kir2.1) (Yang y cols., 1995a; Kubo y Kurata, 2001; John y cols., 2004).

Se ha demostrado que las poliaminas se unen con gran afinidad a un sitio de unión en el que participa el D172 y que se encuentra próximo al filtro de selectividad, mientras que el anillo ácido formado por el E224 y el E299 constituye un sitio de unión de baja afinidad (Figura II.16D) (Xie y cols., 2003; John y cols., 2004). Sin embargo, estos residuos no son los únicos responsables de la rectificación y, de hecho, se ha demostrado la implicación de otros residuos cargados (los ácidos aspárticos en las posiciones 255 y 259, principalmente) (Pegan y cols., 2005; Fujiwara y Kubo, 2006; Kurata y cols., 2007; Baronas y cols., 2014).

Se ha relacionado la cantidad de cargas negativas presentes en la cavidad hidrófila del poro con el grado de rectificación que presenta el canal (Pegan y cols., 2005). Así, los canales que presentan mayor rectificación (Kir2) presentan 5 cargas negativas (los residuos D172, E224, D255, D259 y E299 en Kir2.1) mientras que un canal poco rectificador como es el Kir6.2 sólo presenta una de estas cargas. Sin embargo, la cantidad de cargas negativas no es capaz de explicar por sí sola el fenómeno de la rectificación ya que existen excepciones, como el canal Kir4.1 (muy rectificador, aunque presenta “sólo” 3 cargas) (Fakler y cols., 1996a) o el canal Kir7.1 (poco rectificador, aunque también presenta 3 cargas) (Döring y cols., 1998).

Diversos autores han propuesto mecanismos diferentes para explicar la rectificación (Aleksandrov y cols., 1996; Lee y cols., 1999) ya que existen ciertos detalles del mecanismo de bloqueo, como el origen de la dependencia de voltaje de la rectificación (Shin y Lu, 2005) que siguen sin haber sido plenamente resueltos.



**Figura II.16. Determinantes moleculares de la rectificación interna inducida por poliaminas.** (A) Vista cenital de la región del poro citoplásmico de Kir2.1, con los residuos E224 y E299 orientados hacia el poro y 4 moléculas de diamina (DA8) unidas a ellos. (B) Representación esquemática de la geometría de la región del poro citoplásmico en la que se muestran las distancias intra e intermoleculares entre los residuos E224 y E299. (C) Poliaminas naturales. (D) Estructura general de los canales Kir. Recuadros en rojo se encuentran el filtro de selectividad y los residuos D172, E224, E299, D259 y D255. (E) Modelo de coordinación entre el sitio de unión de las poliaminas en el poro TM (D172) y los sitios de unión en el poro citoplásmico (E224 y E299). [Adaptadas de Xie y cols., 2003 (A) y (B), Baronas y cols., 2014 (C), (D) y (E)]

### 3.3.2. Estructura de los canales Kir

Atendiendo a su secuencia, los canales Kir presentan una homología mayor que la de otros canales de  $K^+$ . Esta homología no se reduce sólo a los segmentos TM (como ocurre en los canales Kv, por ejemplo), sino que se extiende desde aproximadamente 40 aminoácidos antes del primer segmento TM (denominado M1) hasta alrededor de 200 aminoácidos más allá del segundo segmento TM (denominado M2), lo que significa casi los dos tercios de la proteína y sugiere que estas regiones se encuentran formando una estructura organizada, posiblemente con una función común para todos los canales Kir.

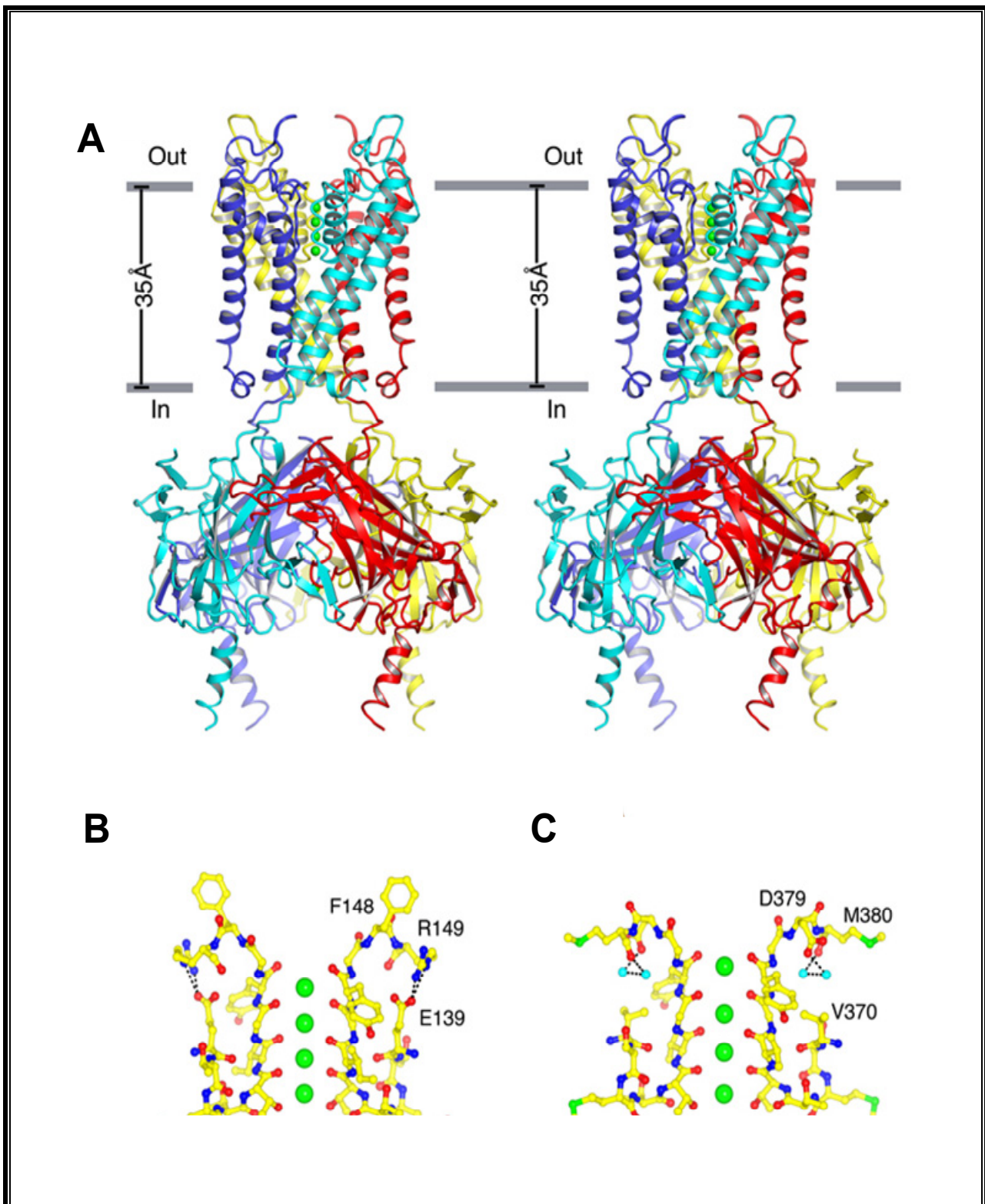
- Dominio TM

Los primeros canales 2TM/1P cristalizados fueron los canales bacterianos *KcsA* (Doyle y cols., 1998) y *MthK* (Jiang y cols., 2002a y 2002b). La estructura resuelta para ambos canales demuestra que están formados por cuatro subunidades  $\alpha$  dispuestas simétricamente alrededor de un poro central. En cada subunidad se observan dos segmentos TM con una estructura de hélice  $\alpha$  (M1 y M2) y segmentos N- y C-terminales intracelulares. El M1 y el M2 están conectados por una secuencia de aproximadamente 30 aminoácidos (“lazo P”) en la que se encuentra una porción con estructura en hélice  $\alpha$  (denominada H5) y el filtro de selectividad del canal (Doyle y cols., 1998; Jiang y cols., 2002a y 2002b). El segmento M2 tapiza la luz del poro, mientras que el segmento M1 se encuentra retranqueado, embebido en la membrana lipídica.

Posteriormente, se resolvió la estructura de los canales bacterianos *KirBac1.1* (Kuo y cols., 2003) y *KirBac3.1* (Kuo y cols., 2005), muy similares a los canales anteriormente descritos pero con una pequeña hélice adicional (“*slide helix*”) situada en el extremo N-terminal del M1 y paralela a la membrana plasmática.

En 2009 se consiguió resolver la estructura completa del canal Kir2.2 de pollo (Figura II.17A) (Tao y cols. 2009). Fue la primera vez que se conseguía cristalizar la estructura completa de un canal Kir eucariota, que comparte un grado elevado de homología tanto con canales Kir2 humanos como con *KirBac1.1* (Figura II.18). Posteriormente en 2011 se resolvería la estructura de este mismo canal en su configuración abierta unida a  $PIP_2$  (fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato) (Hansen y cols. 2011).

Pese a la pequeña diferencia entre los radios atómicos del  $K^+$  (1.33 Å) y del  $Na^+$  (0.95 Å), los canales de  $K^+$  son capaces de discriminar entre ambos iones con una selectividad superior a 1000 veces y conseguir una velocidad de conducción de  $\approx 10^8$  iones/s. El filtro de selectividad se



**Figura II.17. Canales 2TM/1P.** (A) Estructura del canal Kir2.2. Cada una de las cuatro subunidades del tetrámero aparece en diferente color. (B). Filtro de selectividad del canal Kir2.2. (C) Filtro de selectividad de la quimera Kv1.2-Kv2.1. En B y C, carbono (amarillo); nitrógeno (azul); oxígeno (rojo); sulfuro (verde); esferas verdes ( $K^+$ ); puentes de hidrógeno ionizados indicados con líneas negras discontinuas. [Adaptada de Tao y cols., 2009]

encuentra en una región del lazo P formada por una secuencia de aminoácidos (T/SxxTxGYG) altamente conservada en todos los canales de  $K^+$  denominada “secuencia de selectividad al  $K^+$ ” (Figura II.17B y C) (MacKinnon y Yellen, 1990; Heginbotham y cols., 1994; Tao y cols., 2009). A excepción de los aminoácidos que forman el filtro de selectividad, los aminoácidos que forman parte de las paredes del poro son hidrofóbicos para minimizar la interacción electrostática del  $K^+$  con el canal y crear una ruta de baja resistencia que permita fácilmente el paso del ion hidratado desde el citoplasma hasta la cavidad central, donde alcanza una concentración muy elevada ( $\approx 2$  M) (Zhou y cols., 2001).

Una vez en la cavidad central, el ion  $K^+$  pierde su capa de solvatación para acceder al filtro de selectividad. Para compensar el coste energético que supone la deshidratación del ion al atravesar el filtro, los átomos de oxígeno de los radicales carbonilos de los residuos TxGYG hacen las veces de moléculas de agua, de manera que, durante su paso a través del filtro de selectividad, los iones  $K^+$  se encuentran rodeados de 8 átomos de oxígeno en una disposición similar a la que adoptan las moléculas de agua que rodean a los iones  $K^+$  en el medio acuoso (Figura II.17B y C) (Roux y MacKinnon, 1999; Zhou y MacKinnon, 2003). Además, el filtro de selectividad presenta una longitud de  $\approx 12$  Å, por lo que se ha postulado que a lo largo del filtro pueden llegar a encontrarse 2 iones  $K^+$  ( $\approx 2.7$  Å) (Morais-Cabral y cols., 2001; Zhou y MacKinnon, 2003), de manera que la entrada del segundo ion produciría una repulsión electrostática mutua suficiente para compensar la atracción del filtro de selectividad por el primer ion  $K^+$  y así producir su salida hacia el espacio extracelular (Doyle y cols., 1998).

- Dominio citoplásmico

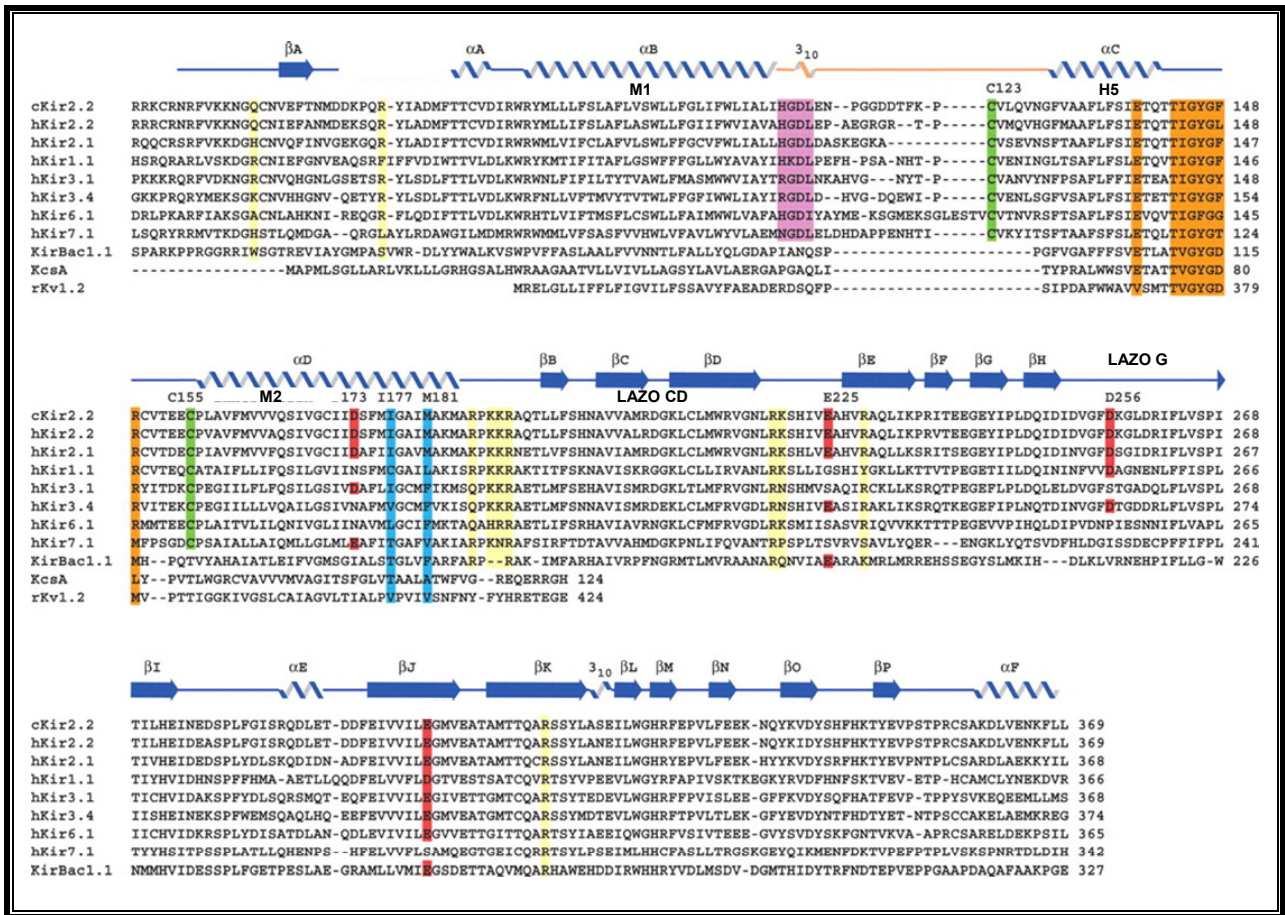
La estructura cristalizada del canal KirBac1.1 se complementa con la de los dominios intracelulares de los canales de mamífero Kir3.1 (Nishida y MacKinnon, 2002; Pegan y cols., 2005) y Kir2.1 (Pegan y cols., 2005). Ambas estructuras comprenden una pequeña porción del extremo N-terminal (aminoácidos del 41 al 64 del Kir2.1 y del 41 al 63 del Kir3.1) y el extremo C-terminal casi completo (aminoácidos del 189 al 428 del Kir2.1 y del 189 al 371 del Kir3.1) (Nishida y MacKinnon, 2002; Pegan y cols., 2005). Además, ambos dominios citoplásmicos fueron cristalizados en ausencia de  $PIP_2$ , un mediador intracelular muy importante en la regulación de la actividad de los canales Kir (ver más adelante), por lo que se ha propuesto que estas estructuras representan el estado cerrado del canal (Nishida y MacKinnon, 2002; Pegan y cols., 2005). Finalmente en 2011 se pudo cristalizar el canal Kir2.2 de pollo unido a  $PIP_2$  mostrando la configuración más abierta del canal (Hansen y cols., 2011), y comparando con los resultados

obtenidos de Kir2.2 en su configuración cerrada (Tao y cols., 2009) se propuso un mecanismo de activación de éste canal por PIP<sub>2</sub> (Hansen y cols., 2011).

El dominio citoplásmico de los canales Kir está formado por aminoácidos de las cuatro subunidades del tetrámero y forma un poro central que permite el paso de los iones K<sup>+</sup> conocido como “poro citoplasmático”. La longitud del poro citoplásmico de los canales Kir es, al menos, la misma que la del poro que forman los segmentos TM (Figura II.16), lo que hace que estos canales presenten dos poros en “tandem” con una longitud total que es aproximadamente el doble de la de otros canales de K<sup>+</sup> (≈60 Å) (Nishida y MacKinnon, 2002; Pegan y cols., 2005). Además, diferentes estudios han permitido determinar que el diámetro del poro citoplásmico es de ≈20 Å en estado abierto (Lu y cols., 1999) y de entre 7 y 15 Å en estado cerrado (Nishida y MacKinnon, 2002), es decir, lo suficientemente amplio como para permitir la presencia de los iones hidratados en su interior en ambos casos.

Las estructuras resueltas muestran una elevada organización en los dominios citoplásmicos de los canales Kir3.1, Kir2.1 y Kir2.2 (Nishida y MacKinnon, 2002; Pegan y cols., 2005; Tao y cols., 2009), habiéndose descrito la presencia de 2 hélices  $\alpha$  ( $\alpha$ A y  $\alpha$ B) y 14 segmentos  $\beta$  ( $\beta$ A a  $\beta$ N) (Figura II.18). Básicamente, en cada subunidad se distinguen tres elementos: dos láminas  $\beta$  (formadas por los segmentos  $\beta$ D,  $\beta$ E,  $\beta$ H y  $\beta$ I la primera y por los segmentos  $\beta$ B,  $\beta$ C,  $\beta$ G y  $\beta$ J la segunda) que se encuentran en el interior de cada subunidad, y una tercera lámina  $\beta$  (formada por los segmentos  $\beta$ A,  $\beta$ L y  $\beta$ M) que se dispone en el exterior, cerca de la cara interna de la membrana (Pegan y cols., 2005; Tao y cols., 2009). En esta tercera lámina, cada uno de los 4 segmentos  $\beta$ A, localizados en los extremos N-terminales (Figura II.18), interacciona con el extremo C-terminal de una subunidad vecina, por lo que se ha sugerido que estos segmentos participan en el ensamblaje de los dominios citoplásmicos de las subunidades Kir.

La parte más estrecha del dominio citoplásmico (2.8-5.7 Å) la constituyen dos lazos que se encuentran mirando hacia el poro, formados por los aminoácidos que se localizan entre los segmentos  $\beta$ C y  $\beta$ D (el “lazo CD”) y entre los segmentos  $\beta$ H y  $\beta$ I (el “lazo G”) (Figura II.18), y que se disponen como un anillo alrededor del eje del poro (Figura II.16B). Curiosamente, ambos lazos se encuentran precedidos por un residuo glicina (la Gly215 antes del lazo CD y la Gly300 antes del lazo G, según la numeración de Kir2.1), lo que sugiere que son secuencias que presentan cierta flexibilidad y movilidad. De hecho, según las estructuras cristalizadas de Kir2.1 y Kir3.1, los lazos G de ambos canales presentan conformaciones diferentes, lo que confirma que se trata de estructuras suficientemente flexibles como para permitir los cambios conformacionales que tienen lugar con la activación del canal (Pegan y cols., 2005; Tao y cols., 2009).



**Figura II.18. Alineamiento de las secuencias de varios canales Kir.** Residuos clave en canales Kir. La estructura secundaria está señalada encima de las secuencias. En rojo (residuos ácidos), verde (cisteínas que forman puentes disulfuro), cian (puerta de activación de la hélice interior), púrpura (residuos conservados entre las torretas de los canales Kir eucariotas), naranja (Filtro de selectividad), y amarillo (residuos críticos para la interacción canal-PIP<sub>2</sub>) [Adaptada de Tao y cols., 2009].

En el canal Kir2.1, la alanina en posición 306 que se encuentra en la parte superior del lazo G constituye el punto de mayor estrechez del poro citoplásmico. Según las estructuras cristalizadas de los dominios intracelulares de Kir2.1 y Kir3.1, la apertura del poro iónico a este nivel no es lo suficientemente amplia como para permitir el paso de ningún ión K<sup>+</sup>, lo que parece confirmar que ambas estructuras representan el estado cerrado del canal. Estudios de mutagénesis demuestran que la sustitución de esta alanina por cualquier otro aminoácido más voluminoso da como resultado canales no funcionales, posiblemente por cambios en la conformación del lazo P que impiden estéricamente el paso de iones K<sup>+</sup> a través del poro (Pegan y cols., 2005; Tao y cols., 2009).

Los aminoácidos del lazo G parecen importantes tanto en la regulación de los canales Kir ya que, por ejemplo, la sustitución de la Cys311 del canal Kir2.1 por residuos polares (serina), cargados (arginina) o alifáticos (alanina) reduce la probabilidad de apertura (Garneau y cols., 2003); como en el *gating* de los canales Kir por promover cambios alostéricos en el filtro de selectividad o por modificar la afinidad por el PIP<sub>2</sub> (Lu y cols., 2001; Garneau y cols., 2003; Pegan y cols., 2005).

Cabe destacar que tanto la propafenona como la flecainida se unen a esta Cys311 del canal Kir2.1 produciendo un aumento selectivo de la  $I_{Kir2.1}$  y de la  $I_{K1}$  ventricular. Pero en Kir2.2 y en Kir2.3 no se produce tal unión pues estos canales carecen de dicha cisteína en posición análoga (ver apartado 3.3.7 y Figura II.20). Por lo tanto ni flecainida ni propafenona aumentan la  $I_{Kir2.2}$  o la  $I_{Kir2.3}$  (Caballero y cols., 2010a; Amorós y cols., 2013; Gómez y cols., 2014). La cavidad central del poro citoplásmico presenta una alta concentración de residuos con carga negativa (Nishida y MacKinnon, 2002; Pegan y cols., 2005), entre los que destacan dos anillos ácidos: el primero formado por dos ácidos glutámicos (E224 y E299), y el segundo, por dos ácidos aspárticos (D255 y D259) (Figura II.16). Como se ha mencionado previamente, ambos anillos están implicados en la rectificación interna que presentan estos canales (Xie y cols., 2003; John y cols., 2004; Pegan y cols., 2005; Fujiwara y Kubo, 2006; Kurata y cols., 2007). Dada la longitud del poro citoplásmico y la concentración de cargas negativas que presenta, Nishida y MacKinnon (2002) han propuesto la posibilidad de que se puedan concentrar varios iones  $K^+$  en esta región del poro. Como no existen sitios específicos de interacción entre esta región del poro y dichos iones, éstos estarían localizados al azar a lo largo del poro (Nishida y MacKinnon, 2002). Con la despolarización de la membrana, se produciría la entrada en el poro de una molécula de poliamina (cargada positivamente) desde el medio intracelular, lo que desplazaría los iones  $K^+$  hacia el poro TM y, de ahí, al medio extracelular. Posteriormente, la interacción de la poliamina con sus sitios de unión bloquearía el poro completamente, impidiendo el paso de más iones  $K^+$  (Nishida y MacKinnon, 2002). Este mecanismo explicaría algunas de las características de la rectificación interna relacionadas con la dependencia de voltaje del bloqueo producido por poliaminas y cationes intracelulares (Lopatin y cols., 1994; Domene y cols., 2003).

La hélice  $\alpha$  presente en el extremo C-terminal del dominio citoplásmico (la hélice  $\alpha B$ ) protruye hacia el interior celular (Figura II.16D) (Nishida y MacKinnon, 2002). La porción del extremo C-terminal que se extiende más allá del segmento  $\beta N$  (donde se incluye esta hélice  $\alpha B$ ) presenta una homología mucho menor entre los diferentes canales Kir que el resto de la proteína, por lo que se puede descartar una función común de esta región para todos ellos. Sin embargo, si se compara la secuencia de esta hélice  $\alpha B$  de los miembros de una misma subfamilia, la homología sigue siendo muy elevada, por lo que se ha propuesto que puede estar participando en las interacciones del canal con otras proteínas o mediadores intracelulares. Esto ocurre, por ejemplo, para los 4 canales Kir regulados por proteínas G (canales Kir3.1-Kir3.4) (Yamada y cols., 1998), por lo que se ha sugerido que esta región podría participar en la regulación de los canales Kir3 por proteínas G (Albsoul-Younes y cols., 2001; Nishida y MacKinnon, 2002). Más allá de la hélice  $\alpha B$ , la estructura del

extremo C-terminal no ha podido ser cristalizada, lo que indica que esta región presenta una estructura extremadamente flexible y desordenada y/o que para formar una estructura rígida precisa de la presencia del extremo N-terminal completo (las estructuras de los dominios citoplásmicos cristalizados carecen de los 40 primeros aminoácidos de este extremo) (Ma y cols., 2011) o de otras proteínas citoplásmicas con las que interacciona (Pegan y cols., 2005). A este respecto, en esta región se ha identificado un dominio PDZ de interacción con proteínas de anclaje a la membrana (PSD-95, SAP102, PSD-93, SAP97, sintrofinas) (Cohen y cols., 1996; Nehring y cols., 2000; Gee y cols., 2000; Inanobe y cols., 2002; Leonoudakis y cols., 2001, 2004a y b, Milstein y cols., 2012).

### 3.3.3. Rectificación interna y excitabilidad cardíaca

A potenciales más negativos que el PR, la  $I_{K1}$  presenta una conductancia mucho mayor que cualquier otra corriente, por lo que es la corriente encargada de fijar el PR cerca del  $E_K$ . Cuando se genera un PA los canales se mantienen cerrados durante toda la fase de meseta y se abren a potenciales más negativos que -20 mV, por lo que la  $I_{K1}$  contribuye también forma crítica a la repolarización durante el final de la fase 3 (Lopatin y Nichols, 2001; Anumonwo y Lopatin, 2010).

De hecho, Zaritsky y cols. demostraron que la ausencia de la  $I_{K1}$  en ratones a los que se abolía los dos alelos del gen *KCNJ2* (ratones Kir2.1<sup>-/-</sup>) produce una despolarización del PR y un aumento de la actividad espontánea en miocitos ventriculares que se acompaña de una prolongación de la DPA (Zaritsky y cols., 2000 y 2001). De la misma forma, en ratones transgénicos a los que se les suprimía la  $I_{K1}$  en un 90% mediante la transfección de un dominante negativo de Kir2.1 (Kir2.1-AAA), que forma canales no funcionales porque tiene mutado el filtro de selectividad, produce una prolongación de la DPA y de los intervalos QRS y QT (McLerie y Lopatin, 2003). Sorprendentemente, el PR de los miocitos ventriculares de estos ratones no se modificaba (McLerie y Lopatin, 2003). En corazones de cobayos en los que también se suprimía la  $I_{K1}$  mediante la transfección de Kir2.1-AAA, se observó además actividad automática en algunos miocitos y, en los registros del ECG, latidos prematuros de origen ventricular (Miake y cols., 2002 y 2003).

Por el contrario, en ratones transgénicos que sobreexpresan Kir2.1, el aumento de la  $I_{K1}$  produce un acortamiento significativo de la DPA y arritmias tanto auriculares como ventriculares (Li y cols., 2004; Piao y cols., 2007b). Noujaim y cols. han demostrado que este aumento de la  $I_{K1}$  permite la estabilización de los frentes espirales de reentrada de alta frecuencia (denominadas rotores), actividad que se suprimía con la administración de concentraciones bajas de Ba<sup>2+</sup>, un inhibidor de la  $I_{K1}$  (Noujaim y cols., 2007).

Cada vez hay más evidencias de que una excesiva heterogeneidad en la repolarización es un factor que determina la aparición de inestabilidad eléctrica en el corazón, insistiendo en la importancia del papel que juega la  $I_{K1}$  en la estabilidad eléctrica cardiaca. En este sentido, estudios realizados en corazones de cobayo sugieren que el gradiente existente entre el ventrículo izquierdo y el derecho en la amplitud de la  $I_{K1}$  puede contribuir a la perpetuación de las arritmias por reentrada en el ventrículo en el cuál la densidad es mayor (el izquierdo) (Samie y cols., 2001). Por otra parte, se ha demostrado que la inhibición de la  $I_{K1}$  es fundamental para la terminación de arritmias ventriculares inducidas en corazones de animales de esta misma especie (Warren y cols., 2003). Asimismo, experimentos en los que se suprimen/sobreexpresan los canales Kir2.1 en un cultivo en monocapa de cardiomiocitos neonatales de rata han demostrado la importancia de la heterogeneidad de la  $I_{K1}$  en la génesis y mantenimiento de los circuitos de reentrada (Sekar y cols., 2009).

La marcada e inusual dependencia de la  $[K^+]_e$  que presenta la  $I_{K1}$  es otro de los mecanismos por el que esta corriente participa en la regulación de la excitabilidad cardiaca. La actividad normal del corazón conlleva grandes variaciones de la  $[K^+]_e$  en el reducido espacio intercelular (entre 0.01 y 5  $\mu\text{M}$ ) (Kline y Morad, 1976; Kline y cols., 1980). Es más, en las fibras de Purkinje, la  $[K^+]_e$  puede sufrir un aumento transitorio con cada latido hasta alcanzar concentraciones en el rango milimolar (Kline y cols., 1980) e incluso existen regiones o estructuras celulares, como los túbulos T, donde la acumulación de  $K^+$  puede llegar a ser mayor (Almers, 1972; Clark y cols., 2001). El incremento de la  $I_{K1}$  asociado a esos aumentos transitorios de la  $[K^+]_e$  tiene consecuencias en la actividad eléctrica cardiaca, modificando, por ejemplo, la DPA o la propagación del impulso cardiaco (Kline y cols., 1980; Coulombe y Coraboeuf, 1983; Nygren y Giles, 2000).

Por último, a pesar de que está ampliamente descrito el papel de la  $I_{K1}$  en la fase final de la repolarización del PA y su participación en la onda T del ECG, se desconoce qué corriente es la responsable (o cuáles, en el caso de que hubiera más de una) de la aparición de la onda U. Sin embargo, recientemente, el análisis de los ECG de pacientes portadores de diferentes mutaciones en el gen *KCNJ2* (Kir2.1) ha sugerido que la amplitud de la onda U viene determinada por la densidad de la  $I_{K1}$  (Postema y cols., 2009).

#### 3.3.4. Densidad de la $I_{K1}$ en los distintos tejidos cardiacos

En todas las especies estudiadas la densidad de la  $I_{K1}$  es mucho mayor en el tejido ventricular que en el auricular (Shah y cols., 1987; Giles e Imaizumi, 1988; Varro y cols., 1993; Melnyk y cols., 2002; Dhamoon y cols., 2004) exceptuando en el ratón (Lomax y cols., 2003). Las

## Introducción

propiedades de la rectificación de la  $I_{K1}$  también varían entre células ventriculares y auriculares, ya que a potenciales despolarizantes la corriente de salida de  $K^+$  es prácticamente nula en células auriculares, mientras que en las ventriculares su amplitud es mucho mayor (Giles e Imaizumi, 1988; Koumi y cols., 1995a). Estas diferencias en la rectificación pueden deberse a que la composición de los canales que generan la  $I_{K1}$  en ambas cámaras sea distinta. En este sentido, Melnyk y cols. demostraron la expresión preferencial de los canales Kir2.3 frente a los Kir2.1 en los miocitos auriculares de perro, mientras que en el tejido ventricular ocurría lo contrario (Melnyk y cols., 2002). Estos resultados coinciden con los descritos para el tejido miocárdico humano. Gaborit y cols. demostraron que la expresión de canales Kir2.3 es máxima en el tejido auricular mientras que es residual en el tejido ventricular humano. Por el contrario la expresión de canales Kir2.1 en el tejido ventricular humano es muy alta (Gaborit y cols., 2007) lo que sugiere que en él los canales Kir2.1 forman homotetrámeros. Otras hipótesis que explicarían las diferencias en la densidad de la  $I_{K1}$  y la intensidad de la rectificación entre tejido auricular y ventricular es que los canales de los dos tejidos presenten diferente sensibilidad a las poliaminas o que las concentraciones intracelulares de poliaminas sean diferentes en aurículas y ventrículos (Lopatin y Nichols, 2001; Anumonwo y Lopatin, 2010).

La densidad de la  $I_{K1}$  es también diferente en ambos ventrículos y en las distintas regiones de un mismo ventrículo. De manera general, la  $I_{K1}$  es mayor en el ventrículo derecho que en el izquierdo (Brunet y cols., 2004; Panama y cols., 2007), aunque existen excepciones como el cobayo, donde es justo al contrario (izquierdo > derecho) (Warren y cols., 2003). En el ventrículo izquierdo del ratón, la densidad de la  $I_{K1}$  es mayor en miocitos apicales que en miocitos epicárdicos (Brunet y cols., 2004), mientras que en el ventrículo izquierdo de gato, la  $I_{K1}$  es mayor en las células endocárdicas que en las epicárdicas (Furukawa y cols., 1992).

La densidad de la  $I_{K1}$  es pequeña en las células del nodo SA de ratón y de rata (Shinagawa y cols., 2000; Cho y cols., 2003) e indetectable en las mismas células de conejo (Shinagawa y cols., 2000). La menor presencia de la  $I_{K1}$  en las células del nodo SA permite el desarrollo de la actividad automática y que el potencial diastólico máximo esté relativamente despolarizado ( $\approx -50$  mV) (Schram y cols., 2002).

En prácticamente todos los tipos celulares cardiacos en los que se ha registrado la  $I_{K1}$ , se ha identificado la presencia de canales Kir en el sarcolema (Anumonwo y Lopatin, 2010). La presencia de dichos canales en los túbulos T es indiscutible, ya que la pérdida de los túbulos T que se produce

a corto plazo en miocitos en cultivo se acompaña de una reducción significativa de la  $I_{K1}$  (Lipp y cols., 1996; Mitcheson y cols., 1996; Christe, 1999). Estos resultados se han visto confirmados además mediante experimentos en los que se estudia el efecto de la acumulación/depleción de  $K^+$  en los túbulos T sobre la corriente. Clark y cols. han demostrado que en miocitos ventriculares de ratón se produce un aumento significativo de las corrientes de cierre de la  $I_{K1}$  en respuesta a un gran flujo de salida de iones  $K^+$  previo (con el consiguiente aumento de la  $[K^+]_e$ ), lo que es consistente tanto con la acumulación de  $K^+$  en el espacio intercelular como con la localización de la  $I_{K1}$  en el restringido espacio de los túbulos T (Clark y cols., 2001). Además, el marcaje mediante anticuerpos específicos para canales Kir2.1, Kir2.2 y Kir2.3 demuestra la localización de éstos en los túbulos T de los miocitos ventriculares (Clark y cols., 2001; Leonoudakis y cols., 2001; Melnyk y cols., 2002).

### 3.3.5. Propiedades de los canales Kir2

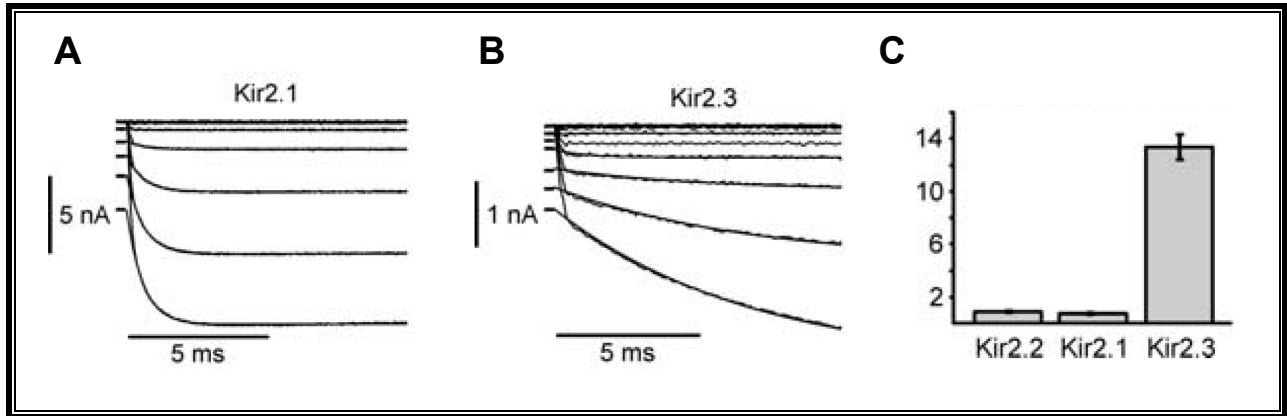
Hasta la fecha se han clonado 5 miembros de la familia Kir2 (Kir2.1, 2.2, 2.3, 2.4 y 2.6) en mamíferos. La expresión de los canales Kir2.4 en el corazón es mínima (sólo se ha demostrado su presencia en las neuronas miocárdicas) (Liu y cols., 2001). La expresión de Kir2.6 únicamente se ha demostrado en músculo esquelético (Ryan y cols., 2010), y la de Kir2.5 no se ha demostrado hasta la fecha en mamíferos (Hassinen y cols., 2008).

| Subunidad | Conductancia (pS) | Sensibilidad al $Ba^{2+}$ | Sensibilidad al pH extracelular | Sensibilidad al pH intracelular |
|-----------|-------------------|---------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Kir2.1    | 20-31             | ++                        | -                               | +                               |
| Kir2.2    | 34-42             | +++                       | -                               | +                               |
| Kir2.3    | 10-14             | +                         | +++                             | +++                             |
| Kir2.4    | ≈15               | +                         | +++                             | ?                               |
| Kir2.6    | ≈34               | ?                         | ?                               | ?                               |

**Tabla II.3. Propiedades de los canales Kir2 expresados en sistemas heterólogos.** La diferencia en la sensibilidad al  $Ba^{2+}$  y al pH entre los canales Kir2 va desde los muy sensibles (+++) hasta los poco (+) o nada (-) sensibles. Tanto las sensibilidades de Kir2.6 al  $Ba^{2+}$ , al pH extra e intracelular como la sensibilidad de Kir2.4 al pH intracelular no han sido determinadas todavía experimentalmente.

Los miembros de la subfamilia Kir2 presentan diferentes características que se resumen en la (Tabla II.3). Exceptuando los canales Kir2.2 y 2.6 que guardan una gran homología en su secuencia (99%) y presentan conductancias muy similares, el resto de canales Kir2.x presentan conductancias específicas que los diferencian entre si (Kubo y cols., 1993a; Morishige y cols., 1993; Makhina y cols., 1994; Morishige y cols., 1994; Perier y cols., 1994; Raab-Graham y cols., 1994; Takahasi y

cols., 1994; Wible y cols., 1995; Töpert y cols., 1998; Choe y cols., 2000; Liu y cols., 2001; Ryan y cols., 2010) y diferencias en la sensibilidad al  $Ba^{2+}$  (Liu y cols., 2001; Preisig-Muller y cols., 2002; Schram y cols., 2003), y al pH intracelular (Qu y cols., 2000; Collins y Larson, 2002) y extracelular (Hughes y cols., 2000; Yan y cols., 2005; Muñoz y cols., 2007).



**Figura II.19. Cinética de activación de los canales Kir2.** (A-B) Trazos representativos de corrientes generadas por los canales Kir2.1 (A) y Kir2.3 (B) registrados al aplicar pulsos entre -130 y -30 mV desde un potencial de fijación de -30 mV. Los ajustes a una función exponencial para obtener la constante cinética de la activación ( $\tau_{act}$ ) se muestran superpuestos a los trazos de corriente. (C) Comparación de las  $\tau_{act}$  de los diferentes canales Kir2 a -115 mV. [Adaptadas de Panama y Lopatin, 2006]

Las subunidades Kir2 presentan también diferentes cinéticas de activación (Figura II.19). La apertura de los canales Kir cardiacos tras la hiperpolarización de la membrana se caracteriza por una fase casi instantánea (activación) seguida de una ligera caída de la corriente dependiente del tiempo producida por cationes extracelulares. La amplitud de ambas fases depende del tipo de canal y de las condiciones experimentales empleadas, pero, en general, la cinética de activación viene determinada principalmente por la cinética de disociación de las poliaminas (y, mayoritariamente, de la espermina) de su sitio de unión en el canal, además de depender en gran medida del  $E_m$  y de la  $[K^+]_e$ . La constante cinética de activación ( $\tau_{act}$ ) es similar en los canales Kir2.1 y Kir2.2 ( $\approx 0.5-2$  ms), mientras que es  $\approx 7-9$  veces mayor en los canales Kir2.3 (Figura II.19) (Panama y Lopatin, 2006; Panama y cols., 2007).

### 3.3.6. Composición de los canales que generan la $I_{K1}$

Como ya se ha mencionado, Gaborit y cols. describieron el año 2007 de forma detallada el patrón de la expresión de los diferentes miembros de la subfamilia Kir2 (excepto Kir2.4) en los distintos tejidos cardiacos humanos (Gaborit y cols., 2007). Estos autores encontraron diferencias

significativas en el patrón de expresión entre el epicardio y el endocardio del lado derecho del corazón para las subunidades Kir2.1 (expresión más elevada en el endocardio derecho), para Kir2.2 (expresión más elevada en el epicardio derecho) y para Kir2.3 (expresión más elevada en el endocardio derecho) (Tabla II.4). Asimismo, se han encontrado diferencias en la expresión de las diferentes subunidades Kir2.x en las fibras de Purkinje (Kir2.1 ~ Kir2.3 > Kir2.2), en el ventrículo derecho (Kir2.1 > Kir2.2 ~ Kir2.3), en la aurícula derecha (Kir2.3 > Kir2.2 > Kir2.1) y en la aurícula izquierda (Kir2.2 > Kir2.3 > Kir2.1) (Gaborit y cols., 2007) (Tabla I.4). Aunque estos resultados contradicen los que se habían obtenido en un estudio anterior (Wang y cols., 1998).

|               | AI (n=7) |      | VI (n=7) |      | EpiI (n=7) |      | EndoI (n=7) |      | AD (n=5) |      | VD (n=5) |      | EpiD (n=8) |      | EndoD (n=8) |      | FP (n=8) |      |
|---------------|----------|------|----------|------|------------|------|-------------|------|----------|------|----------|------|------------|------|-------------|------|----------|------|
|               | media    | EEM  | media    | EEM  | media      | EEM  | media       | EEM  | media    | EEM  | media    | EEM  | media      | EEM  | media       | EEM  | media    | EEM  |
| <b>Kir2.1</b> | 45.3     | 9.9  | 144.9    | 30.6 | 132.8      | 20.4 | 131.7       | 19.3 | 49.8     | 7.3  | 200.6    | 25.8 | 125.9      | 18.6 | 165.5       | 22.9 | 72.6     | 10.2 |
| <b>Kir2.2</b> | 304.1    | 37   | 177.7    | 29.7 | 187.9      | 38.6 | 163.2       | 43.2 | 116.5    | 25.3 | 125      | 21.6 | 83         | 5.4  | 61.4        | 7.8  | 46.8     | 6.6  |
| <b>Kir2.3</b> | 88       | 11.2 | 163.6    | 29.8 | 109.9      | 25.9 | 132.7       | 21.8 | 213.1    | 41.2 | 106.1    | 25.8 | 51.7       | 12.2 | 75.8        | 7    | 61.6     | 10.8 |

**Tabla II.4. Niveles de expresión de los canales Kir2.x en corazón humano.** A (aurícula); V (ventrículo); I (izquierdo); D (derecho); Epi (epicardio); Endo (endocardio); FP (fibras de Purkinje). Cada condición se expresa en media  $\pm$  EEM de la expresión relativa ( $2^{-\Delta Ct}$ ) obtenida para cada gen frente a HPRT (hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa) (x100). [Adaptada de Gaborit y cols., 2007]

Para averiguar la composición de los canales que generan la  $I_{K1}$  se han llevado a cabo diferentes aproximaciones, entre ellas, diferenciar la presencia de los distintos tipos de canales en función de su conductancia. En miocitos auriculares y ventriculares, se han registrado corrientes unitarias que presentaban conductancias que iban desde los  $\approx 10$ -15 pS (correspondientes a canales Kir2.3) hasta los  $\approx 40$ -45 pS (correspondientes a canales Kir2.2), pasando por conductancias intermedias ( $\approx 21$ -28 pS, correspondientes a canales Kir2.1) (Sakmann y Trube, 1984a; Matsuda, 1988; Burnashev y Zilberter, 1986; Wible y cols., 1995; Liu y cols., 2001). Sin embargo, la frecuencia con la que se detectan dichas conductancias depende de la especie y del tejido estudiado. El uso de oligonucleótidos antisentido (AsODN) contra el ARNm de Kir2.1 en miocitos ventriculares de rata produjo una drástica reducción de la  $I_{K1}$  (Nakamura y cols., 1998) lo que sugería que los canales Kir2.1 eran los mayoritarios. Posteriormente, Zaritsky y cols. ablacionaron los genes que codifican las proteínas Kir2.1 y Kir2.2 en ratones (ratones Kir2.1<sup>-/-</sup> y Kir2.2<sup>-/-</sup>, respectivamente) (Zaritsky y cols., 2000). Los miocitos ventriculares de los ratones Kir2.1<sup>-/-</sup> (que apenas sobrevivían unas horas tras el nacimiento) carecían de  $I_{K1}$ , demostrando que en esta especie también los canales Kir2.1 son

esenciales para la generación de la  $I_{K1}$ . Por el contrario, los ratones Kir2.2<sup>-/-</sup> sí eran viables y presentaban  $I_{K1}$ , aunque ésta era menor a la registrada en miocitos de animales normales (Zaritsky y cols., 2000), lo que sugería que estos canales también participaban en la  $I_{K1}$ .

También se ha tratado de averiguar la composición de los canales que generan la  $I_{K1}$  atendiendo a las diferencias que presentan cada uno de los miembros de la subfamilia Kir2 respecto a propiedades como la sensibilidad al  $Ba^{2+}$ , al pH o la cinética de activación (Tabla II.3). Schram y cols. han demostrado que la sensibilidad al  $Ba^{2+}$  de los canales Kir2.1+Kir2.3 es mayor a la que presentan cada uno de ellos por separado y similar a la que presentan los canales Kir2.2, pero diferente a la que presenta la  $I_{K1}$  registrada en miocitos ventriculares humanos, lo que confirma la participación de varias subunidades Kir2.x diferentes en la generación de la  $I_{K1}$  humana (Schram y cols., 2003).

Como se ha mencionado, los canales Kir2.x también se diferencian en su cinética activación (Figura II.19). Analizando la cinética de activación de la  $I_{K1}$  registrada en miocitos de ratón y de cobayo se ha sugerido que la participación de los canales Kir2.3 en la corriente en dichos animales es minoritaria (Yan y cols., 2005; Panama y cols., 2007). Por el contrario, el estudio de la sensibilidad al pH de la  $I_{K1}$  registrada en miocitos ventriculares de oveja ha demostrado una gran contribución de los canales Kir2.3 a la génesis de la  $I_{K1}$  en dichos miocitos (Tabla II.3) (Muñoz y cols., 2007).

### 3.3.7. Regulación de la $I_{K1}$

- Modulación por cationes ( $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ )

En experimentos de fijación de voltaje se ha observado que la amplitud de la  $I_{K1}$  disminuye tras la aplicación mantenida de un pulso hiperpolarizante (Maughan, 1976; Baumgarten y cols., 1977; Sakmann y Trube, 1984b), disminución que es debida a la inhibición dependiente de voltaje producido por cationes extracelulares (Biermans y cols., 1987), siendo el  $Na^+$  el principal ion implicado en dicho proceso en los músculos cardíaco y esquelético (Standen y Stanfield, 1979). En miocitos ventriculares de cobayo, la eliminación de  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  del medio extracelular hace desaparecer de forma casi completa la reducción de la  $I_{K1}$  dependiente del tiempo (Sakmann y Trube, 1984b; Shieh, 2000). Efectivamente, el  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  extracelular son bloqueantes débiles de los canales Kir2.x.

El  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular produce una inhibición dependiente de voltaje de la  $I_{K1}$  (Matsuda y Cruz, 1993). Aunque el  $\text{Ca}^{2+}$  es un inhibidor menos potente que el  $\text{Mg}^{2+}$  y sus concentraciones intracelulares medias son bastante bajas, hay bastantes evidencias de que las  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  pueden tener efectos dinámicos sobre la  $I_{K1}$ . Por ejemplo, los aumentos transitorios de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  que tienen lugar durante el PA producen la inhibición de la  $I_{K1}$  en miocitos ventriculares de cobayo (Zaza y cols., 1998). Estos resultados sugieren que los canales que generan la  $I_{K1}$  se localizan en espacios como los túbulos T, regiones restringidas y próximas a los lugares en los que se produce la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior celular y la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el retículo.

La unión del  $\text{Mg}^{2+}$  intracelular al canal depende del  $E_m$ , por lo que la velocidad de repolarización de la membrana afecta a las cinéticas de asociación/disociación de este ion y, por tanto, a la amplitud de la  $I_{K1}$ . De hecho, se ha descrito que la amplitud de la  $I_{K1}$  de salida depende en gran medida de la velocidad con la que se repolariza la membrana (Ishihara, 1997; Ishihara y Ehara, 1998).

Los iones  $\text{Ba}^{2+}$  son los cationes divalentes que con mayor potencia inhiben de la  $I_{K1}$  (DiFrancesco y cols., 1984) y, de hecho, la inhibición producido por el  $\text{Ba}^{2+}$  extracelular se considera una de las características que definen a las corrientes rectificadoras internas, por lo que ha sido ampliamente utilizado para caracterizar los nuevos canales clonados como miembros de la familia Kir. Como se ha mencionado, cada una de las subunidades Kir2 posee diferente sensibilidad al  $\text{Ba}^{2+}$  (Liu y cols., 2001; Preisig-Müller y cols., 2002; Schram y cols., 2003).

- Estimulación adrenérgica

En general, está ampliamente aceptado que tanto la estimulación adrenérgica  $\alpha$  (Fedida y cols., 1991; Braun y cols., 1992) como la  $\beta$  (Koumi y cols., 1995b) producen una reducción de la  $I_{K1}$ , aunque también hay resultados en sentido contrario (Gorostiza y cols., 1995). Sin embargo, la mayoría de estos trabajos se han centrado en el estudio de la corriente de entrada de la  $I_{K1}$ , sin prácticamente atender a los efectos sobre la corriente de salida, que es la realmente relevante a nivel fisiológico. Un estudio en miocitos ventriculares de cobayo ha demostrado que la estimulación  $\beta$ -adrenérgica produce una reducción significativa de la corriente de entrada, causando una mínima (casi nula) inhibición de la corriente de salida (Koumi y cols., 1995b). A esta disparidad de resultados contribuye también la coexistencia de diferentes tipos de receptores adrenérgicos en el corazón. Por ejemplo, se ha demostrado que la estimulación de receptores  $\beta_1$  produce la

disminución de la  $I_{K1}$ , mientras que la estimulación de receptores  $\beta_3$  produce el aumento de las corrientes generadas por los canales Kir2.1 (mediado por PKC) y Kir2.2 (mediado por PKA), aunque no de la generada por los canales Kir2.3 (Scherer y cols., 2007), y la estimulación de receptores  $\alpha_{1A}$  produce la inhibición de las corrientes generadas por los canales Kir2.2 y Kir2.3, pero no de la generada por los canales Kir2.1 (Zitron y cols., 2008).

- Modulación por poliaminas

Las concentraciones celulares de poliaminas se regulan por un complejo sistema de enzimas (Seiler, 1994) dando lugar a niveles de poliaminas libres que son suficientes para producir la rectificación interna de los canales Kir descrita anteriormente. La concentración citoplásmica de cada poliamina está regulada para que cada una de ellas juegue un papel específico en la función de los canales (Lopatin y cols., 1995), por lo que sus niveles se ajustan de forma dinámica para producir la rectificación en el rango fisiológico en el que se mueven los potenciales de membrana.

Experimentalmente, se ha demostrado que la manipulación de las concentraciones de poliaminas pueden modular las corrientes generadas por canales Kir2 (Bianchi y cols., 1996; Shyng y cols., 1996; Lopatin y cols., 2000). Por ejemplo, Bianchi y cols. (1996) han demostrado en basófilos de rata que la rectificación interna se atenuaba tras un tratamiento con un inhibidor específico de la S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMDC), ya que este inhibidor producía el aumento de las concentraciones de putrescina y la disminución de las concentraciones de espermidina y espermina (Bianchi y cols., 1996). Asimismo, ratones transgénicos en los que se elimina el gen de la espermina sintasa presentaban unos niveles indetectables de espermina y un aumento de 5 veces en los niveles de espermidina, lo que se traducía en una  $I_{K1}$  con una menor rectificación y cinéticas de activación más rápidas (Lopatin y cols., 2000). Por otro lado, la sobreexpresión de la ornitina descarboxilasa (ODC) en corazones de ratón, a pesar de que producía un aumento de los niveles intracelulares de putrescina de más del 35%, apenas ocasionaba un ligero aumento de la amplitud de la  $I_{K1}$ , lo que sugiere que la putrescina juega un papel poco importante en la regulación de la  $I_{K1}$  (Lopatin y cols., 2000). Por el contrario, se ha demostrado que la eliminación de la putrescina intracelular sí afecta a la rectificación de los canales Kir2.3 (Shyng y cols., 1996), mientras que la eliminación de la putrescina del medio extracelular lleva a la depleción de sus niveles intracelulares, así como de los de espermidina y espermina, produciendo también modificaciones en las características cinéticas de Kir2.3 (Lopatin y cols., 1995).

- Modulación por pH

La sensibilidad de la  $I_{K1}$  al pH depende del tejido y de la especie estudiada, posiblemente debido a la diferente composición de los canales que la generan (Tabla II.3). En miocitos ventriculares de rata y cobayo, la  $I_{K1}$  es insensible a la  $[H^+]_i$  (Ito y cols., 1992; Komukai y cols., 2002a y 2002b), mientras que la  $I_{K1}$  registrada en miocitos ventriculares de oveja sí es inhibida por la  $[H^+]_i$  que se encuentran en el rango fisiológico (Muñoz y cols., 2007). Dado que los canales Kir2.3 son más sensibles a la  $[H^+]_i$  que los Kir2.1 y Kir2.2 (Tabla II.3) (Yan y cols., 2005), estos resultados son consistentes con la importante contribución de los canales Kir2.3 a la  $I_{K1}$  en estos miocitos (Dhamoon y cols., 2004). De hecho, se ha descrito que son las subunidades Kir2.3 las que confieren sensibilidad al pH a los heterotetrámeros Kir2.1+Kir2.3 (Muñoz y cols., 2007), siendo la treonina en posición 53 el residuo responsable de la sensibilidad al pH en los canales Kir2.3 (Qu y cols., 2000).

Los canales Kir1.1 (homólogos de Kir2.1, pero con una rectificación interna más débil) son sensibles a las  $[H^+]_i$  que se encuentran en el rango fisiológico (Tsai y cols., 1995). La gran sensibilidad del canal Kir1.1 a los cambios en el pH está relacionada con la presencia de una lisina en la posición 80 (Fakler y cols., 1996b), ya que la neutralización de este residuo resulta en la pérdida de sensibilidad al pH intracelular. Por su parte, la sustitución del residuo homólogo en el canal Kir2.1 por una lisina (M84K) hace que este canal adquiera sensibilidad al pH intracelular (Fakler y cols., 1996b). Además, los canales que se forman tras el ensamblaje de subunidades Kir2.1 con otros miembros de la familia Kir2 sensibles al pH (p.e., Kir2.3) sí que presenten sensibilidad al pH (Muñoz y cols., 2007).

- Modulación por  $PIP_2$

El  $PIP_2$  es un importante segundo mensajero de una gran variedad de vías de señalización (Hilgemann, 1997; Hilgemann y cols., 2001). La primera corriente con rectificación interna de la que se describió su modulación por el  $PIP_2$  fue la  $I_{K,ATP}$  (Hilgemann y Ball, 1996) y, desde entonces, se ha descrito que el  $PIP_2$  es capaz de modular todos los canales Kir tanto en células nativas como en sistemas de expresión heterólogos (Logothetis y cols., 2007; Lopes y cols., 2007).

El  $PIP_2$  produce la apertura de los canales Kir, mientras que su eliminación produce el cierre de los mismos (Huang y cols., 1998; Shyng y cols., 2000; Lopes y cols., 2002; Rohacs y cols., 2003; Logothetis y cols., 2007; Hansen y cols., 2011). En este sentido, Rohacs y cols. (1999) demostraron que el  $PIP_2$  es un potente activador de los canales Kir2.1, mientras que su modulación de otros canales Kir (como los canales Kir3.1 o Kir3.4) es más débil (Rohacs y cols., 1999). Además, se ha

## Introducción

demostrado la importancia de la localización de los dos grupos fosfato en las posiciones 4 y 5 de la molécula de PIP<sub>2</sub>, ya que el cambio de posición o la eliminación de estos sustituyentes disminuye la afinidad de estos compuestos por los canales Kir2.1 (Rohacs y cols., 1999). El PIP<sub>2</sub> también afecta a las propiedades de los miembros de la subfamilia Kir2. Por ejemplo, se ha demostrado que la modulación de los canales Kir2.3 por el pH, la ACh o el miristato-acetato de forbol (PMA, *Phorbol Myristate Acetate*) depende de las interacciones entre el PIP<sub>2</sub> y el canal (Logothetis y cols., 2007).

Se han identificado numerosos residuos implicados en la modulación de los canales Kir2 por el PIP<sub>2</sub>, aunque la mayoría de ellos se localizan en la parte superior del dominio citoplásmico (la más próxima a la cara interna de la membrana plasmática) y en la *slide helix* (Lopes y cols., 2002; Decher y cols., 2007; Logothetis y cols., 2007). Por ello, se ha propuesto que el PIP<sub>2</sub> modula los canales Kir interaccionando con los extremos N- y C-terminales de los canales, aproximando el dominio intracelular a la cara citoplásmica de la membrana y “forzando” de esta manera la apertura del canal (Logothetis y cols., 2007). Las interacciones entre el PIP<sub>2</sub> y el canal Kir2.1 producen un aumento de la probabilidad de apertura del canal, favoreciendo la estabilización del mismo en el estado abierto y facilitando las transiciones desde el estado cerrado hacia el abierto (Xie y cols., 2008). En 2011, Hansen y cols. demostraron mediante cristalografía de rayos X que el PIP<sub>2</sub> se une a la interfase entre el dominio TM y el dominio citoplasmático de Kir2.2 permitiendo un cambio conformacional en el canal que pasa del estado cerrado al abierto (Hansen y cols., 2011). El estudio demostraba que eran indispensables para la unión a las cadenas acilo y al fosfato en posición 1' del PIP<sub>2</sub> los aminoácidos R78, W79 y R80 (posiciones en Kir2.2) situados en el dominio TM. Por su parte, los aminoácidos K183, R186, K188 y K189 (posiciones en Kir2.2) situados en el dominio citoplasmático jugarían un papel fundamental en la unión a los fosfatos del PIP<sub>2</sub> en posiciones 4' y 5'.

- Determinantes moleculares del tráfico, expresión en membrana y densidad de la corriente de los canales Kir2.x

Se han identificado numerosos residuos implicados en la modulación del tráfico, la expresión en membrana y la corriente de los canales Kir2.x. Alineando las secuencias de Kir2.1, 2.2 y 2.3 se pueden diferenciar que las principales secuencias de regulación se encuentran en los extremos N y C-terminales de las 3 subunidades (Figura II.20).



**Figura II.20. Alineamiento de secuencia de los canales Kir2.x humanos.** En rosa se indica cuando las secuencias son idénticas o muy parecidas. Recuadrada en negro secuencia de salida del RE. Recuadrada en rojo y en verde señales de salida del aparato de Golgi. Recuadrada en azul Cys311 en Kir2.1 responsable de la unión a flecaínida y propafenona. Recuadrada en púrpura secuencia de fosforilación para PKA (RRES) y secuencia de unión a dominios PDZ (SEI, SAI).

La secuencia FCYENE correspondiente a las posiciones 374-379 de Kir2.1 es fundamental para que se produzca la salida del canal del RE, de hecho, mutaciones en esta región disminuyen la expresión en membrana de los canales Kir2.x (Figura II.20) (Ma y cols., 2001). Por otro lado, tanto la secuencia RXR correspondiente a los aminoácidos 44 y 46 de Kir2.1, como SSYLANE (posiciones 313-319 en Kir2.1) conforman una señal de salida del Golgi cuando se unen el extremo N y C-terminal y forman una estructura terciaria que cuando está intacta permite que el canal supere los controles de calidad (Ma y cols., 2011) (Figura II.20). Asimismo, sólo en la posición 311 de

Kir2.1 se encuentra una cisteína (en Kir2.2 y Kir2.3 se encuentra una alanina), lo que le confiere sensibilidad a la flecainida y propafenona que, a concentraciones incluso por debajo de las alcanzadas tras administrar dosis terapéuticas aumentan la  $I_{Kir2.1}$  (Caballero y cols., 2010a; Gómez y cols., 2014) (Figura II.20) (ver apartado 3.3.2). Por último en el extremo C-terminal (posiciones 422-427 en Kir2.1) se encuentran solapadas una secuencia de fosforilación por PKA (RRES) y una secuencia de unión a dominios PDZ (SEI, SAI), siendo la fosforilación y defosforilación de esta serina fundamental para la unión a las proteínas con dominios PDZ como SAP97 y  $\alpha$ -1-sintrofina (Leonoudakis y cols., 2001; 2004a; 2004b; Vaidyanathan y cols., 2010).

### 3.3.8. La $I_{K1}$ en diversas patologías

Tanto la  $I_{K1}$  auricular como los niveles de ARNm de Kir2.1 están aumentados en pacientes con FA crónica (Van Wagoner y cols., 1997; Bosch y cols., 1999; Dobrev y cols., 2001 y 2002; Gaborit y cols., 2005 y 2007; Nattel y cols., 2008 y 2010; González de la Fuente y cols., 2013). El aumento de la corriente contribuye en gran medida al acortamiento de la DPA, así como al mantenimiento y perpetuación de la arritmia (Dhammon y Jalife, 2005). En muestras de pacientes con insuficiencia cardiaca congestiva, se han descrito efectos diferentes en la  $I_{K1}$  de miocitos ventriculares y de miocitos auriculares. Concretamente, en los miocitos ventriculares humanos, se ha descrito una disminución significativa de la  $I_{K1}$  (Beuckelmann y cols., 1993), al igual que en conejo (Pogwidz y cols., 2001) y en rata (Fauconnier y cols., 2005). Por el contrario, en los miocitos auriculares humanos, se ha descrito una disminución de la  $I_{K1}$  (Koumi y cols., 1994).

Muchos estudios han demostrado que la  $I_{K1}$ , al igual que otras corrientes de  $K^+$ , disminuye en ratas espontáneamente hipertensas y en modelos animales de hipertrofia cardiaca (Brooksby y cols., 1993; McIntosh y cols., 1998; Näbauer y Kääb, 1998; Mitarai y cols., 2000). A este respecto, es importante resaltar que numerosos trabajos han demostrado que la hipertrofia cardiaca aumenta las concentraciones de poliaminas (Caldarera y cols., 1974; Bartolome y cols., 1980), por lo que es probable que la reducción de la  $I_{K1}$  sea consecuencia de dicho aumento. Sin embargo, en un modelo felino de hipertrofia ventricular, la  $I_{K1}$  aumenta en los miocitos del ventrículo derecho (Kleiman y Houser, 1989), mientras que no se modifica en los del ventrículo izquierdo (Furukawa y cols., 1993).

Los miocitos ventriculares humanos de regiones que sufren isquemia crónica presentan un PR más despolarizado y una DPA prolongada, especialmente en la fase final de la repolarización (Mubagwa y cols., 1994), lo que concuerda con la reducción de la  $I_{K1}$  que se produce tras un infarto de miocardio (Lue y Boyden, 1992; Beuckelmann y cols., 1993; Pinto y Boyden, 1998). Durante el estrés metabólico (p.e., durante la isquemia), el marcado aumento de la  $I_{K,ATP}$  enmascara muchos de los efectos que ocurren en otras corrientes de  $K^+$  como la  $I_{K1}$ . Sin embargo, utilizando glibenclamida como inhibidor de la  $I_{K,ATP}$ , Xie y cols. lograron demostrar que la iodacetamida, un inductor de estrés metabólico, inhibe la  $I_{K1}$  (Xie y cols., 1997). Además, la inhibición inducida por  $Ba^{2+}$  de la  $I_{K1}$  en miocitos ventriculares de conejo elimina la protección frente al estrés metabólico que produce el preconditionamiento isquémico, un papel que clásicamente se había asignado a la  $I_{K,ATP}$  (Díaz y cols., 2004). Por último, diversos estudios sugieren que la  $I_{K1}$  aumenta en condiciones de hipoxia/anoxia (Ruíz-Perich y cols., 1991) o en presencia de cianida (Muramatsu y cols., 1990). De hecho, se ha demostrado que el acortamiento de la DPA que se produce en la fase aguda de la hipoxia está mediado por la  $I_{K1}$  y no por la  $I_{K,ATP}$  (Piao y cols., 2007a).

Por último, es importante resaltar que la modulación de la relación I-V por la  $[K^+]_e$  no sólo es una característica biofísica sino que tiene implicaciones fisiopatológicas, ya que la  $[K^+]_e$  se eleva durante los episodios isquémicos o en presencia de taquiarritmias como resultado de una acumulación de iones  $K^+$  en los espacios intercelulares y en las proximidades de los túbulos T (Sejersted y Sjogaard, 2000).

### *Canalopatías asociadas a los canales Kir2.1*

Hasta la fecha, se han descrito 4 tipos de síndromes arritmogénicos primarios [el síndrome de Andersen-Tawil (SAT) o también conocido como síndrome de QT largo tipo 7 -SQT7-, el síndrome de QT corto tipo 3 (SQT3), la taquicardia ventricular polimórfica inducida por catecolaminas (TVPC) y la FA familiar] asociados a mutaciones que producen la pérdida o la ganancia de función de los canales Kir (Figura II.21). Curiosamente sólo se han identificado arritmias familiares secundarias a mutaciones en el gen que codifica las subunidades Kir2.1 (*KCNJ2*) y no en los genes que codifican los canales Kir2.2 o Kir2.3.

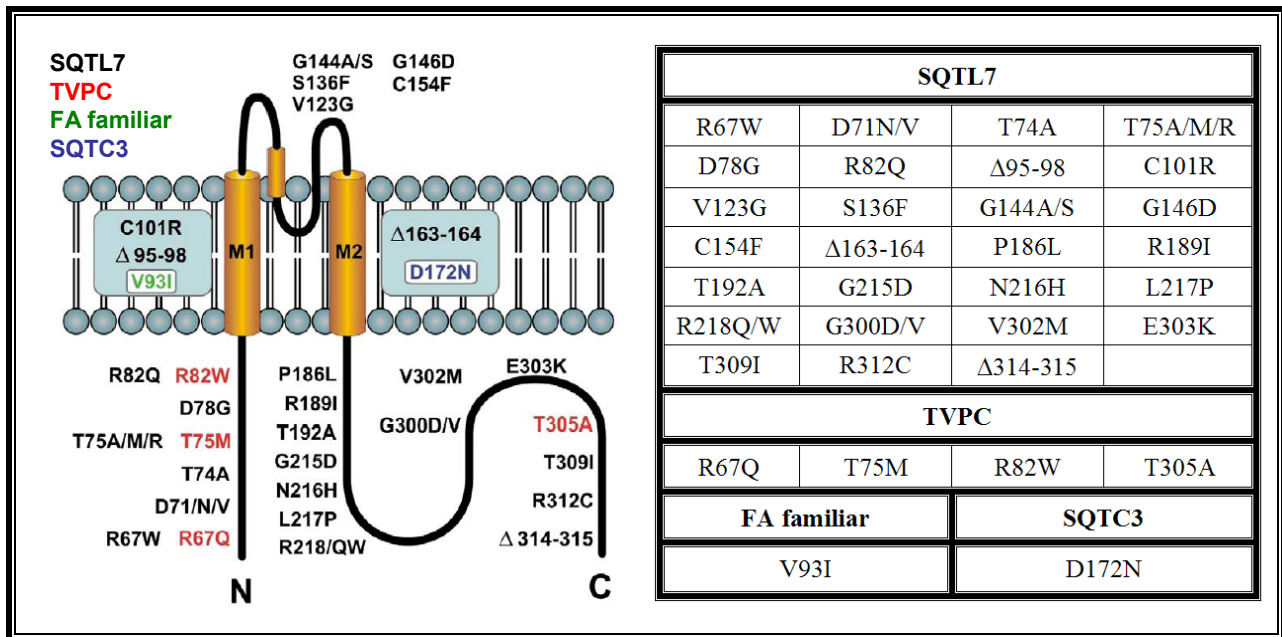


Figura II.21. Mutaciones en la subunidad Kir2.1 asociadas con canalopatías. En el dibujo, las diferentes mutaciones siguen el siguiente código de color: negro para el SQTL7, rojo para el TVPC, verde para la FA familiar y azul para el SQTC3. [Adaptada de Anumonwo y Lopatin, 2010]

- SAT

El SAT es una enfermedad hereditaria que se caracteriza por parálisis periódicas y diferentes alteraciones multiorgánicas entre las que se encuentran la escoliosis, el paladar hendido, baja estatura y la debilidad muscular (Plaster y cols., 2001; Donaldson y cols., 2003; Terzic y cols., 2008). Las alteraciones en la actividad eléctrica cardiaca incluyen la prolongación del intervalo QT del ECG (por eso se conoce también como SQTL tipo 7), rachas de taquicardia ventricular y la aparición de múltiples focos ectópicos ventriculares tras la estimulación adrenérgica. Sin embargo, Zhang y cols. (2005b) han sugerido que la clasificación del SAT como SQTL7 podría no ser del todo correcta, ya que las modificaciones en el ECG características del SAT están más relacionadas con alteraciones del complejo T-U (Zhang y cols., 2005b). Un amplio estudio genético permitió relacionar el SAT con el brazo largo del cromosoma 17, precisamente donde se localiza el *locus* del gen *KCNJ2* (Kir2.1), por lo que se buscaron posibles mutaciones en este gen. Este estudio demostró que más de la mitad de los pacientes con SAT presentaban mutaciones en el gen *KCNJ2* (Plaster y cols., 2001), por lo que se denomina como tipo 1 (SAT1) cuando están afectados los canales Kir2.1 (Plaster y cols., 2001; Andelfinger y cols., 2002; Schulze-Bahr, 2005; Zhang y cols., 2005b).

Se han identificado más de 33 mutaciones en el gen *KCNJ2* relacionadas con el SAT1 (Figura II.21), todas ellas caracterizadas por la pérdida de función del canal Kir2.1, lo que origina la prolongación del intervalo QT y predispone al paciente a sufrir arritmias cardiacas. Debido a que el

SAT1 es un trastorno autosómico dominante (un alelo mutado y otro sano), Plaster y cols. (2001) estudiaron en oocitos de *Xenopus* los efectos de coexpresar las subunidades mutadas y las WT para dos de estas mutaciones (D71V y R218Q), demostrando que las subunidades mutadas tenían un efecto dominante negativo por lo que los canales que contenían la subunidad mutada no eran funcionales (Plaster y cols., 2001). Además, la pérdida de función de los canales producida por la mutación en la mayor parte de los casos es debida a que disminuye la interacción del canal mutado con el PIP<sub>2</sub> (Plaster y cols., 2001; Lopes y cols., 2002; Pegan y cols., 2006; Terzic y cols., 2008). Es el caso de las mutaciones R218Q y R218W (Plaster y cols., 2001; Lopes y cols., 2002). Estos residuos ocupan las posiciones equivalentes a los identificados mediante difracción de rayos X como responsables de la interacción con el PIP<sub>2</sub> en canales Kir2.2 cristalizados (Hansen y cols., 2011).

- Síndrome de QT corto

En el año 2005, Priori y cols. describieron la tercera variante del SQTC (SQTC3), relacionada con una mutación en el gen *KCNJ2* (Priori y cols., 2005). Esta mutación produce una ganancia de función en los canales Kir2.1, por lo que se traduce en un aumento en el flujo de salida de K<sup>+</sup> y, en consecuencia, en una aceleración de la repolarización.

El SQTC3 se caracteriza por la aparición de ondas T asimétricas en el ECG (Priori y cols., 2005). El análisis genético de los miembros de una familia con SQTC3 permitió la identificación de una mutación en el gen *KCNJ2* en la que se produce la sustitución de un ácido aspártico por una asparragina en la posición 172 (D172N) de la subunidad Kir2.1 (Priori y cols., 2005). Este ácido aspártico es un aminoácido altamente conservado dentro de la familia Kir2 y, como se ha mencionado, juega un papel crítico en la rectificación de estos canales (Lu y MacKinnon, 1994; Stanfield y cols., 1994; Yang y cols., 1995a). La coexpresión del canal mutado con el WT en sistemas de expresión heterólogos genera una corriente significativamente mayor a la generada por homotetrámeros de canales WT. Además, mediante simulaciones por ordenador se demostró que el aumento de la corriente de salida de K<sup>+</sup> causado por la mutación podía explicar el aumento y la asimetría de las ondas T del ECG que presentaban los pacientes (Priori y cols., 2005). Por último, aunque no se podían realizar estudios de susceptibilidad a las arritmias en estos pacientes, las simulaciones por ordenador predecían que las mutaciones causantes del SQTC3 predisponían a estos pacientes a un mayor riesgo de sufrir arritmias por reentrada (Priori y cols., 2005).

En los últimos años se han descrito nuevas mutaciones en *KCNJ2* como por ejemplo M301K y E299V asociadas a SQTC3, aunque el mecanismo que lleva al acortamiento del QT parece diferir respecto a D172N. Mientras esta última mutación incrementa la corriente de salida sin modificar las

propiedades rectificadoras del canal, las mutaciones M301K y E299V aumentan la corriente por disminuir la rectificación del canal (Hattori y cols., 2012; Deo y cols., 2013). Es decir, un mecanismo similar al producido por la flecainida, la propafenona, y otros fármacos con una estructura similar a la del farmacóforo de los fármacos capaces de unirse a la Cys311. Por eso, se ha propuesto que todos estos fármacos tienen un potencial proarrítmico importante que debería evaluarse (Caballero y cols., 2010a; Gómez y cols., 2014). Es más, la capacidad de aumentar la  $I_{K1}$  como consecuencia de la disminución de la rectificación sería responsable del alto potencial proarrítmico ventricular de fármacos como la flecainida y la propafenona.

- FA familiar

Estudios previos en pacientes con FA ya habían relacionado esta enfermedad con mutaciones en los genes *KCNQ1* (Chen y cols., 2003b) y *KCNE2* (Yang y cols., 2004). Xia y cols. (2005) identificaron una mutación relacionada con la FA familiar en el gen *KCNJ2*. En este caso, la sustitución de una valina por una isoleucina en la posición 93 (p.V93I) produce un aumento de la  $I_{K1}$  por un mecanismo no identificado por los autores (Xia y cols., 2005). Lo que no se ha explicado es el porqué estos pacientes no presentaban arritmias a nivel ventricular y un intervalo QT breve.

- Taquicardia ventricular polimórfica inducida por catecolaminas (TVPC)

La TVPC es una arritmia hereditaria en la que los pacientes presentan arritmias ventriculares y muerte súbita asociadas al ejercicio físico y a la estimulación adrenérgica (Leenhardt y cols., 1995; Tester y cols., 2006). Se han descrito varios tipos de TVPC asociados con problemas en el manejo del  $Ca^{2+}$  en los que están implicados los canales RyR (TVPC tipo 1) (Priori y cols., 2002) o la calsequestrina (TVPC tipo 2) (Postma y cols., 2002). En un estudio genético realizado en una cohorte de 541 pacientes con TVPC, se identificaron cuatro mutaciones en el gen *KCNJ2* (R67Q, T75M, R85W y T305A) que producían la pérdida de función de los canales Kir2.1. En el momento actual se desconoce que relación presentan los aminoácidos mutados con los efectos de la estimulación adrenérgica del canal Kir2.1 (Eckhardt y cols., 2007). El ECG de los pacientes con estas mutaciones presentaba ondas U prominentes, actividad ectópica ventricular y rachas de taquicardia ventricular polimórfica. Sin embargo, no sufrían alteraciones musculares esqueléticas (Eckhardt y cols., 2007) o dismórficas similares a las que presentan los pacientes con SAT. Cuando los mutantes se expresaban en sistemas heterólogos, la amplitud de la corriente disminuía un 95% con respecto a la generada por canales WT. Más aún, los canales R67Q y T75M producían efecto dominante negativo cuando se coexpresaban con los canales WT.

#### 4. CANALES DE Na<sup>+</sup>

Los canales de Na<sup>+</sup> dependientes de voltaje son proteínas TM fundamentales en la génesis y propagación de la señal eléctrica en tejidos excitables como el corazón, el músculo esquelético o el sistema nervioso (Hodgkin y Huxley, 1952a y 1952b; Catterall, 2000; Yu y Catterall, 2003; George, 2005). Como se ha mencionado la  $I_{Na}$  cardíaca es responsable de la despolarización (fase 0) de los PAs Na<sup>+</sup>-dependientes y, por tanto, de la excitabilidad y la velocidad de conducción cardíacas. Además, participa en el control de la fase de meseta (fase 2) y, por tanto, de la DPA y de la refractariedad cardíacas (Brown y cols., 1981; Fozzard y cols., 1985).

##### 4.1. Estructura de los canales de Na<sup>+</sup>

Los canales de Na<sup>+</sup> dependientes de voltaje están compuestos por una subunidad conductora  $\alpha$  (de la que se han caracterizado 9 isoformas) y una o varias subunidades accesorias  $\beta$  ( $\beta_1$  a  $\beta_4$ ) (Figura II.22 y Tabla II.5) (Catterall, 2000; Goldin, 2002; Catterall y cols., 2005a; Catterall, 2012).

- Subunidad  $\alpha$

Las subunidades  $\alpha$  de los canales de Na<sup>+</sup> pertenecen a una pequeña familia de proteínas con una secuencia de aminoácidos altamente conservada que se expresan en diferentes tejidos y cuyas propiedades no son idénticas (Goldin, 2002).

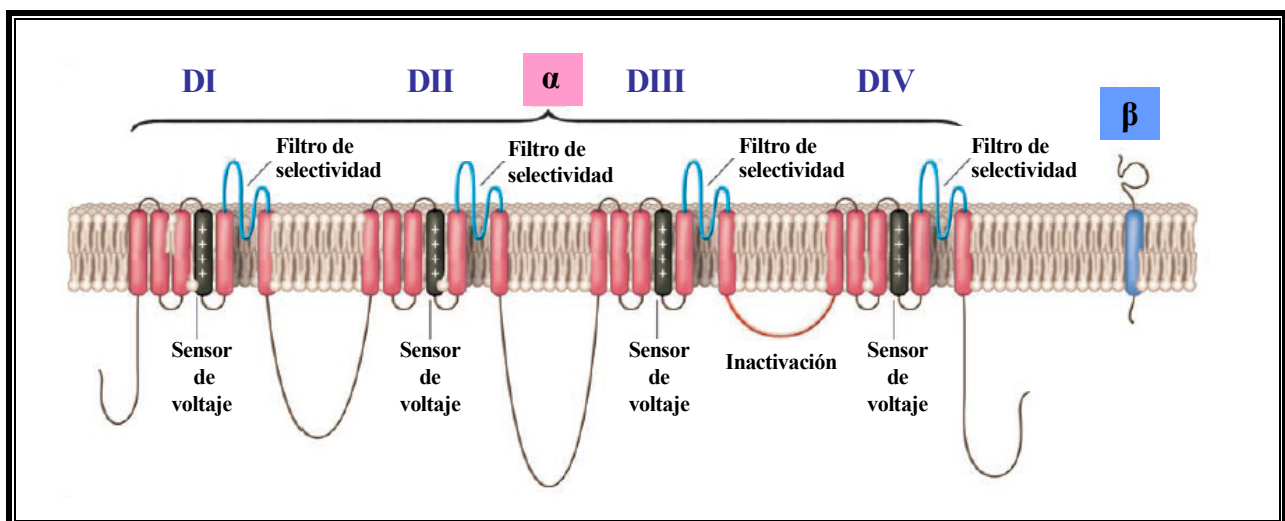
| Subunidad $\alpha$ |                        |           |        | Subunidad $\beta$ |                                |           |        |
|--------------------|------------------------|-----------|--------|-------------------|--------------------------------|-----------|--------|
| Gen                | Proteína               | Cromosoma | Tejido | Gen               | Proteína                       | Cromosoma | Tejido |
| <i>SCN1A</i>       | Nav1.1* ( $\alpha_1$ ) | 2q24      | SNC    | <i>SCN1B</i>      | Nav $\beta$ 1.1* ( $\beta_1$ ) | 19q11     | SNC    |
| <i>SCN2A</i>       | Nav1.2 ( $\alpha_2$ )  | 2q23      | SNC    | <i>SCN2B</i>      | Nav $\beta$ 2.1* ( $\beta_2$ ) | 11q24     | SNC    |
| <i>SCN3A</i>       | Nav1.3* ( $\alpha_3$ ) | 2q24      | SNC    | <i>SCN3B</i>      | Nav $\beta$ 3.1* ( $\beta_3$ ) | 11q26     | SNC    |
| <i>SCN4A</i>       | Nav1.4* ( $\alpha_4$ ) | 17q21     | ME     | <i>SCN4B</i>      | Nav $\beta$ 4.1 ( $\beta_4$ )  | 11q24     | SNC    |
| <i>SCN5A</i>       | Nav1.5* ( $\alpha_5$ ) | 3p21      | MC     |                   |                                |           |        |
| <i>SCN8A</i>       | Nav1.6* ( $\alpha_8$ ) | 2q13      | SNC    |                   |                                |           |        |
| <i>SCN9A</i>       | Nav1.7                 | 2q24      | T      |                   |                                |           |        |
| <i>SCN10A</i>      | Nav1.8*                | 3p22      | SNP    |                   |                                |           |        |
| <i>SCN11A</i>      | Nav1.9                 | 3p21      | SNC    |                   |                                |           |        |

**Tabla II.5. Subunidades que forman el canal de Na<sup>+</sup> dependiente de voltaje en el hombre.** \*Subunidades que se expresan en el corazón, siendo Nav1.5 la isoforma predominante en el corazón. MC: Músculo cardíaco. ME: Músculo esquelético. SNC: Sistema nervioso central. SNP: Sistema nervioso periférico. T: Tiroides. [Adaptada de Nerbonne y Kass, 2005]

El gen *SCN5A* localizado en el cromosoma 3p21 codifica la subunidad  $\alpha$  Nav1.5, responsable de la

## Introducción

$I_{Na}$  cardiaca. Esta subunidad, de unos 227 kDa de peso molecular, está formada por 4 dominios homólogos (DI a DIV), con 6 segmentos TM dispuestos en  $\alpha$ -hélice cada uno (S1 a S6). Los dominios se conectan entre sí mediante tres secuencias hidrofílicas no conservadas, denominadas “*interdomain linker loops*” (ID I, II, y III). El lazo que une los segmentos S5 y S6, denominado “lazo P”, es extracelular, determina la selectividad iónica y forma parte del poro (Poet y cols., 2001). Los extremos amino- y carboxilo-terminal (N- y C-terminal, respectivamente) y los lazos de unión entre los diferentes dominios son intracelulares (Catterall, 2000; Goldin, 2002; Yu y Catterall, 2003; George, 2005) (Figura II.22). Se ha descrito que la subunidad Nav1.5 no es la única isoforma cuyo ARNm se expresa en el corazón (Nerbonne y Kass, 2005), e incluso algunas como Nav1.4 y Nav1.8 parecen estar implicadas en la regulación de la  $I_{Na}$  cardiaca (Hu y cols., 2014; Bissay y cols., 2016).



**Figura II.22. Estructura del canal de  $Na^+$ .** Esquema de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del canal de  $Na^+$ . En la subunidad  $\alpha$ , se indica el sensor de voltaje, el filtro de selectividad y los diferentes dominios (DI a DIV). [Adaptada de George, 2005].

Por lo que respecta a la estructura terciaria, clásicamente, se ha considerado que los S5 y los S6, junto a los lazos P, estarían orientados hacia el interior, formando las paredes del poro. La mayor parte de los residuos que forman los S5 y S6 de los 4 dominios son hidrófobos. Por su parte, los S4 presentan un residuo cargado (arginina o lisina) cada tres aminoácidos, formando una hélice de cargas positivas en la membrana. En total, hay 22 aminoácidos cargados positivamente (cuatro cargas positivas en el DI, cinco en los DII y DIII y ocho en el DIV) que aparecen conservados en todas las isoformas del canal de  $Na^+$  y que actúan como “sensor de voltaje” (Stühmer y cols., 1989). Los modelos estructurales consideran que los S4 se encuentran rodeados por el resto de los segmentos TM. La teoría más aceptada acerca del movimiento del sensor de voltaje es que los S4 se mueven físicamente a través de la membrana desde el interior hacia el exterior en respuesta a la

despolarización, exponiendo al exterior dos cargas positivas que se encontraban previamente “enterradas” en el interior de la membrana (Yang y cols., 1996; Bezanilla, 2000 y 2002).

Cuatro de los residuos presentes en los lazos P forman un anillo que se denomina “locus DEKA”: ácido aspártico en DI, ácido glutámico en DII, lisina en DIII y alanina en DIV (Figura II.22). Esta estructura determina la conductancia y la selectividad iónica del canal al  $\text{Na}^+$ , así como la unión de toxinas (Noda y cols., 1989; Terlau y cols., 1991). La sustitución de estos cuatro aminoácidos por residuos de ácido glutámico (que son los aminoácidos presentes en las posiciones análogas en el canal de  $\text{Ca}^{2+}$ ) convierte los canales de  $\text{Na}^+$  en selectivos para el  $\text{Ca}^{2+}$  (Heinemann y cols., 1992).

La región C-terminal intracelular del canal Nav1.5 (los 243 últimos aminoácidos) contiene varios dominios importantes de interacción con proteínas, de los cuales los mejor caracterizados son el dominio IQ de unión a calmodulina (CaM), un dominio PY y un dominio de unión a PDZ (Shy y cols., 2013).

Los PDZ (ver apartado 5.6 para más detalle) son dominios conservados, identificados en numerosas proteínas cuya función es generalmente de anclaje y estabilización en membrana. El canal Nav1.5 tiene definidos un dominios de unión a PDZ: en el C-terminal (SIV) fundamental entre otros para la unión del canal a sintrofina.

Varios canales iónicos se regulan mediante ubiquitinación, una modificación postraduccional que produce la degradación o reciclaje de las proteínas diana. Proteínas con una secuencia consenso [L/P]PxY (conocido como dominio PY) se unen específicamente a proteínas de la familia Nedd4. Dicho dominio está en el C-terminal de casi todos los canales de sodio dependientes de voltaje, menos en Nav1.4, Nav1.9 y  $\text{Na}_x$  (Shy y cols., 2013).

El dominio IQ con la secuencia consenso IQxxxRxxxxR presente en el dominio C-terminal del canal Nav1.5 es un dominio de unión a CaM. La CaM (ver apartado 4.3) es una proteína ácida con cuatro sitios de unión al  $\text{Ca}^{2+}$  de alta afinidad. Aunque se ha demostrado la interacción directa de CaM con el dominio IQ de Nav1.5, las consecuencias de esta interacción muestran resultados contradictorios (aumento o disminución de la corriente, modulación de la inactivación) (Deschenes y cols., 2002; Tan y cols., 2002). Estas inconsistencias pueden deberse al uso de distintas especies, sistemas de expresión o protocolos usados.

Por otro lado, el lazo DI-DII del canal tiene una región que contiene numerosos sitios de fosforilación.

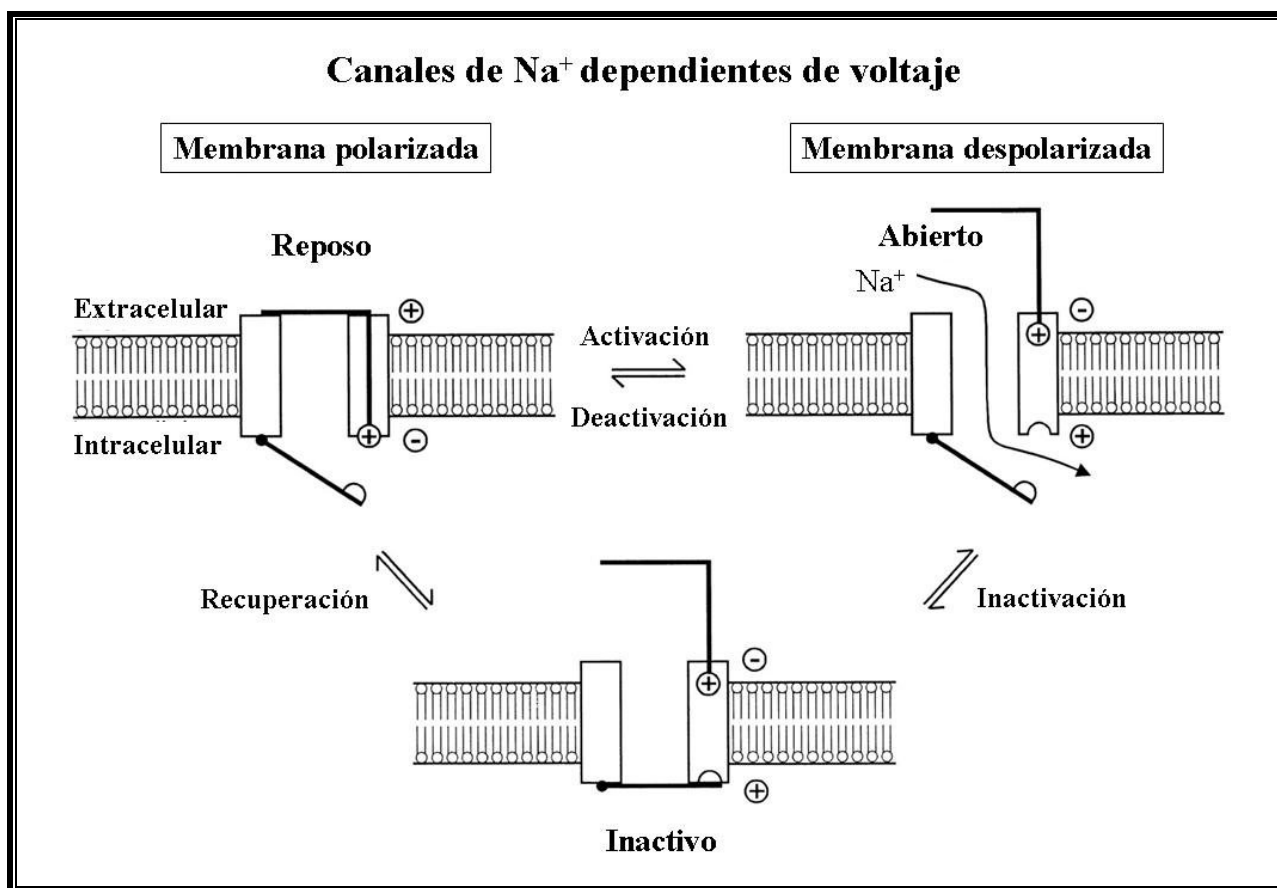
- Subunidades auxiliares

A pesar de que el canal se compone de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , la subunidad  $\alpha$  puede *per se* generar una corriente de sodio. La estequiometría y tipo de subunidades que forman los canales cardiacos de  $\text{Na}^+$  *in vivo* se conocen parcialmente. En mamíferos se han identificado 4 isoformas ( $\beta_1$  a  $\beta_4$ ) de las subunidades reguladoras del canal de  $\text{Na}^+$  (Tabla II.5) (Morgan y cols., 2000; Malhotra y cols., 2001; Goldin, 2002; Yu y cols., 2003). Dichas subunidades  $\beta$  son proteínas con un único dominio TM, un extremo N-terminal extracelular y un extremo C-terminal intracelular que presentan una secuencia tipo inmunoglobulina (Ig) que las diferencia del resto de subunidades accesorias (Isom y Catterall, 1996). Estas subunidades no forman parte del poro conductor del canal.

Todas las isoformas identificadas se encuentran en el SNC, pero sólo algunas de ellas se han encontrado en el corazón (Tabla II.5) Se ha propuesto que el motivo Ig puede participar en la modulación del *gating* del canal (Chen y Cannon, 1995; Makita y cols., 1996; McCormick y cols., 1998 y 1999). Además las subunidades  $\beta_1$  regulan la expresión en la membrana, la localización y la unión con otras moléculas de la matriz extracelular y del citoesqueleto de la subunidad  $\alpha$  (Isom y Catterall, 1996). Más aún, la subunidad Nav $\beta_1$ .1 disminuye la afinidad de anestésicos locales y fármacos antiarrítmicos del grupo I por la subunidad  $\alpha$  Nav1.5 (Balser y cols., 1996; Makielski y cols., 1996; Balser, 2001). Sea como sea, la importancia de estas subunidades queda recalçada en distintas patologías relacionadas con alteraciones en la  $I_{\text{Na}}$  asociadas a mutaciones en estas proteínas auxiliares (Amin y cols, 2010). Por ejemplo, hay mutaciones en las subunidades  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$  asociadas a síndromes arritmogénicos como el síndrome de Brugada (SBr) (Watanabe y cols., 2008; Riuró y cols., 2013; Hu y cols., 2009) y mutaciones en la subunidad  $\beta_4$  asociadas a síndrome de QT largo (SQTL) tipo 10 (Medeiros-Domingo y cols., 2007). Por último, la subunidad  $\beta_1$  parece jugar un papel fundamental en las interacciones entre subunidades  $\alpha$  al ser totalmente necesaria para producir el efecto dominante negativo (EDN) de un mutante del canal Nav1.5 asociado a SBr (Mercier y cols., 2012).

#### 4.2. Características de la $I_{\text{Na}}$

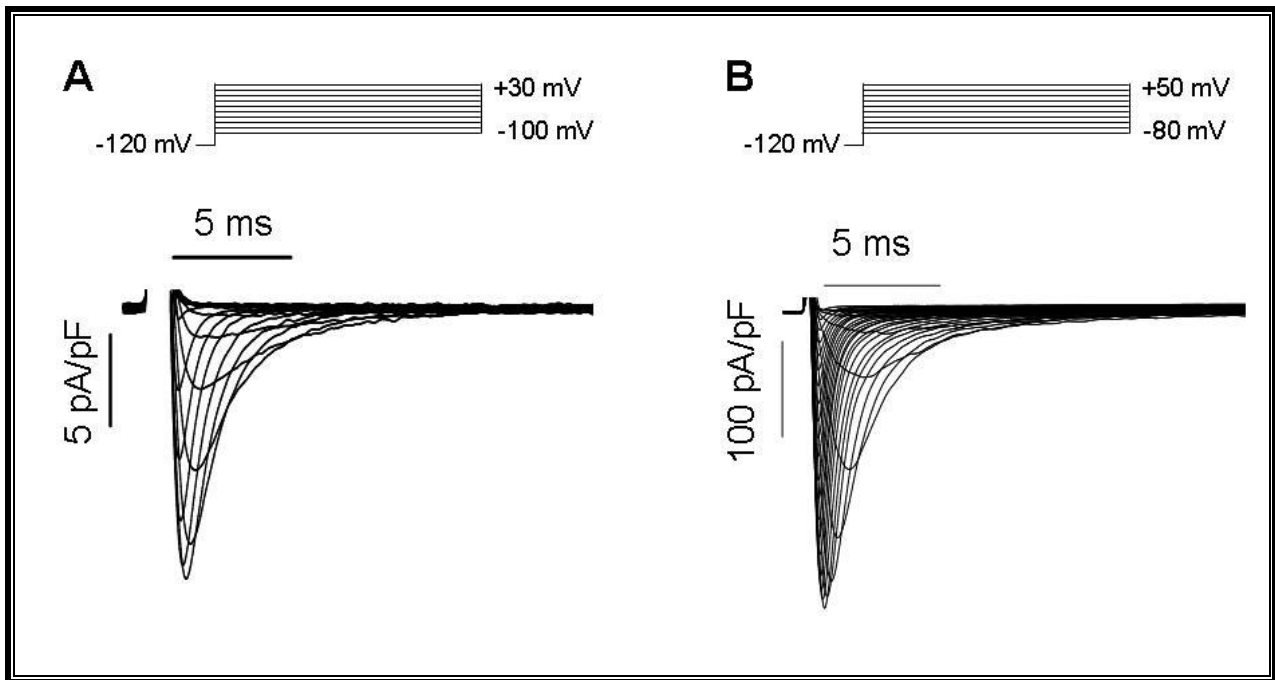
El canal de  $\text{Na}^+$  presenta, al menos, tres estados conformacionales: reposo, activo e inactivo (Figura II.23). Se denomina “*gating*” de un canal a las transiciones tiempo-dependientes entre los estados conformacionales del canal debido a los cambios en el potencial de membrana (“voltage-dependent *gating*”).



**Figura II.23. Modelo cinético del *gating* del canal de Na<sup>+</sup>.** Modelo cinético sencillo donde únicamente aparecen tres estados para el canal de Na<sup>+</sup>: abierto, inactivo y cerrado. [Adaptada de Lehmann-Horn y Jurkat-Rott, 1999].

Durante la diástole, cuando el potencial eléctrico TM está alrededor de los -85 mV, el canal de sodio se encuentra en estado de reposo y la probabilidad de que se abra es extremadamente baja. La despolarización de la membrana produce un cambio conformacional en la estructura del canal (en la región S4) que causa su apertura durante 1-2 ms, generándose una corriente rápida de entrada de Na<sup>+</sup>, que, por su parte, origina la rápida despolarización de la membrana durante la fase 0 del PA (Hirschberg y cols., 1995; Yang y Horn, 1995) (Figura II.23 y II.25A y B). La  $I_{Na}$  alcanza un pico máximo en 0.5-1 ms, y, a continuación, se inactiva de forma rápida lo que produce el cese de la entrada de Na<sup>+</sup> (Catterall, 2000; Yu y Catterall, 2003) (Figura II.23 y II.24).

El umbral de activación de la corriente se encuentra en -60 mV y alcanza su valor máximo entre -30 y -20 mV (Hodgkin y Huxley, 1952a y 1952b; Armstrong, 1981). La inactivación no sólo cierra el canal, sino que impide la reapertura del mismo hasta que haya pasado el tiempo suficiente para su recuperación (reactivación, ver más adelante), determinando así la frecuencia máxima de excitación celular y preservando el gradiente iónico intracelular, lo que impide la muerte celular.



**Figura II.24. Características de la  $I_{Na}$  cardiaca.** (A) Trazos de  $I_{Na}$  registrados en nuestro laboratorio de miocitos auriculares humanos tras la aplicación de pulsos de 50 ms a potenciales entre -100 y +30 mV desde un potencial de fijación de -120 mV con una concentración de  $Na^+$  en la solución externa de 5 mM. (B)  $I_{Na}$  registrada en nuestro laboratorio en células CHO transfectadas con las subunidades  $\alpha$  Nav1.5 y  $\beta$ 1 tras la aplicación de pulsos de 50 ms a potenciales entre -80 y +50 mV desde un potencial de fijación de -120 mV con una concentración de  $Na^+$  en la solución externa de 136 mM.

La inactivación de la  $I_{Na}$  cardiaca sigue un proceso biexponencial, presentando un componente rápido y uno lento (Rudy, 1978; Saikawa y Carmeliet, 1982; Clarkson y cols., 1984; Patlak y Ortiz, 1985; Balsler, 2001). La rapidez de la activación y la inactivación sugiere que ambos procesos podrían estar acoplados (Aldrich y cols., 1983; Catterall, 2000; Balsler, 2001; Ulbricht, 2005). En ocasiones, los canales de  $Na^+$  pueden transitar directamente desde el estado abierto al estado cerrado; a este proceso se le denomina “deactivación del canal” (Figura II.23) (Horn y cols., 1981).

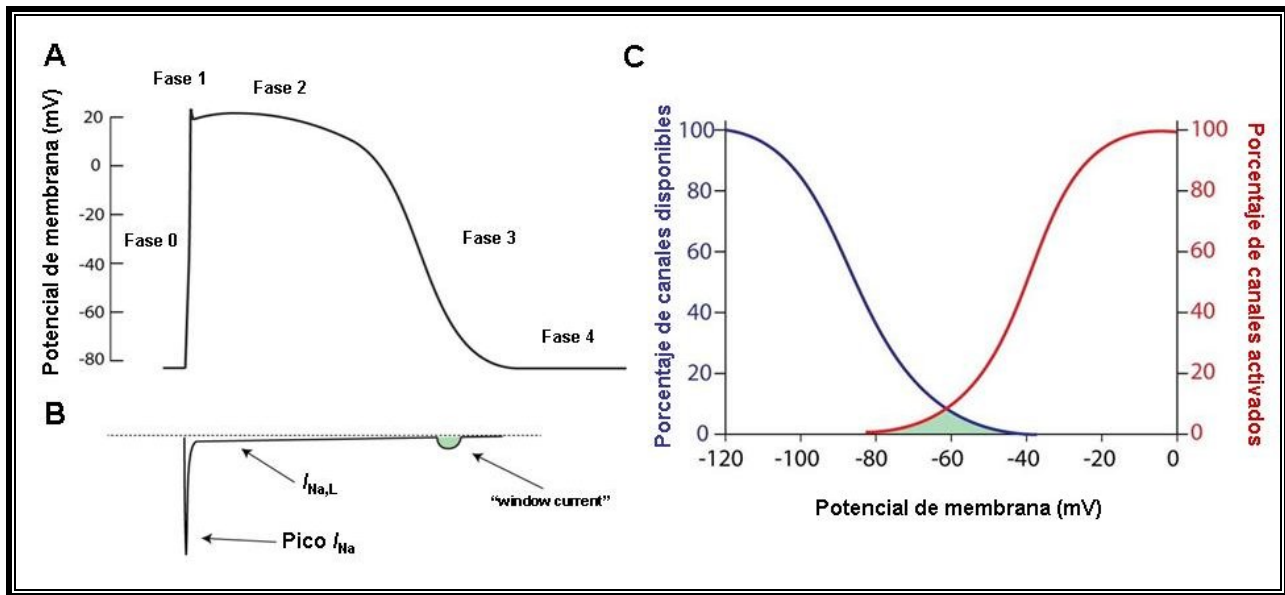
Se ha propuesto que la inactivación rápida del canal de  $Na^+$  se produce por el mecanismo denominado de “bola y cadena” según el cual la compuerta de activación del canal se abre y la “bola” inicia un movimiento que permite su unión con la boca citoplasmática del canal a la que ocluye, impidiendo la entrada de  $Na^+$  (Armstrong y Bezanilla, 1977). Se ha demostrado la “bola” que se balancea y ocluye la boca citoplasmática del canal está formada por tres residuos hidrofóbicos presentes en el lazo DIII-DIV, la “secuencia IFM”, muy conservada entre especies y entre subtipos del canal (Ile1488, Phe1489 y Met1490) (Eaholtz y cols., 1994). De hecho, la delección de dichos residuos abole la inactivación rápida del canal (Bennett y cols., 1995; Kellenberg y cols., 1996). También se han identificado los residuos del segmento S6 o en el lazo

S4-S5 del DIV de la boca citoplasmática que actúan de receptor de la “bola”. Además, el extremo C-terminal participa en la estabilización de la inactivación rápida, disminuyendo la probabilidad de reapertura (Mantegazza y cols., 2001; Cormier y cols., 2002; Motoike y cols., 2004). La “inactivación lenta” es un proceso que se prolonga durante varios cientos de ms y que es responsable del control de la entrada de  $\text{Na}^+$  durante la fase de meseta del PA cardíaco, contribuyendo de este modo al mantenimiento de dicha fase del PA (Clarkson y cols., 1984; Carmeliet, 1987; Fozzard y cols., 1987; Balsler, 2001). La inactivación lenta disminuye al aumentar la  $[\text{Na}^+]_e$  (Oxford y Yeh, 1985) y parece estar regulado por un complicado mecanismo en el que están involucrados los cuatro dominios del canal (O’Reilly y cols., 1999; Vilin y cols., 1999).

El paso desde el estado inactivo hasta el estado de reposo se denomina “reactivación del canal” y es un proceso necesario para que éste pueda volver a abrirse (Figura II.23). En situaciones fisiológicas, esta transición tiene lugar durante los primeros 50-100 ms de la diástole por lo que, considerando que en ritmo sinusal (RS) el intervalo diastólico es de entre 500 y 700 ms, cuando llega el siguiente latido la mayoría de los canales ya están en fase de reposo y, por lo tanto, preparados para volver a abrirse (Catterall, 2000; Yu y Catterall, 2003).

Por último, una mínima fracción de canales de sodio puede permanecer abierta y no inactivarse completamente. Esta fracción de corriente de sodio ha sido denominada y estudiada como  $I_{\text{Na,L}}$  (corriente tardía de sodio, persistente o *late*) y se ha demostrado que un incremento de esta corriente es arritmogénica, pues lleva a la prolongación de la fase 2 del PA (Makielski y Farley, 2006; Makielski, 2009), pudiendo dar lugar a un SQTl (Figura II.25B y C, II.28 y II.29A, B y C).

Además, algunos canales pueden reactivarse durante la fase de repolarización del PA en un rango de potenciales en el que la inactivación no es completa y se solapa con la activación. Se denomina *window current* por ese rango (“*window*”) de potenciales en el que se produce el pequeño grado de solapamiento entre las curvas de activación y de inactivación. Por lo tanto, en dicho rango de potenciales hay una fracción de canales de sodio que están activos y no inactivos, donde los parámetros de la activación en el estado estacionario y la inactivación no llegan a ser cero (Attwell y cols., 1979) (Figura II.25B y C).

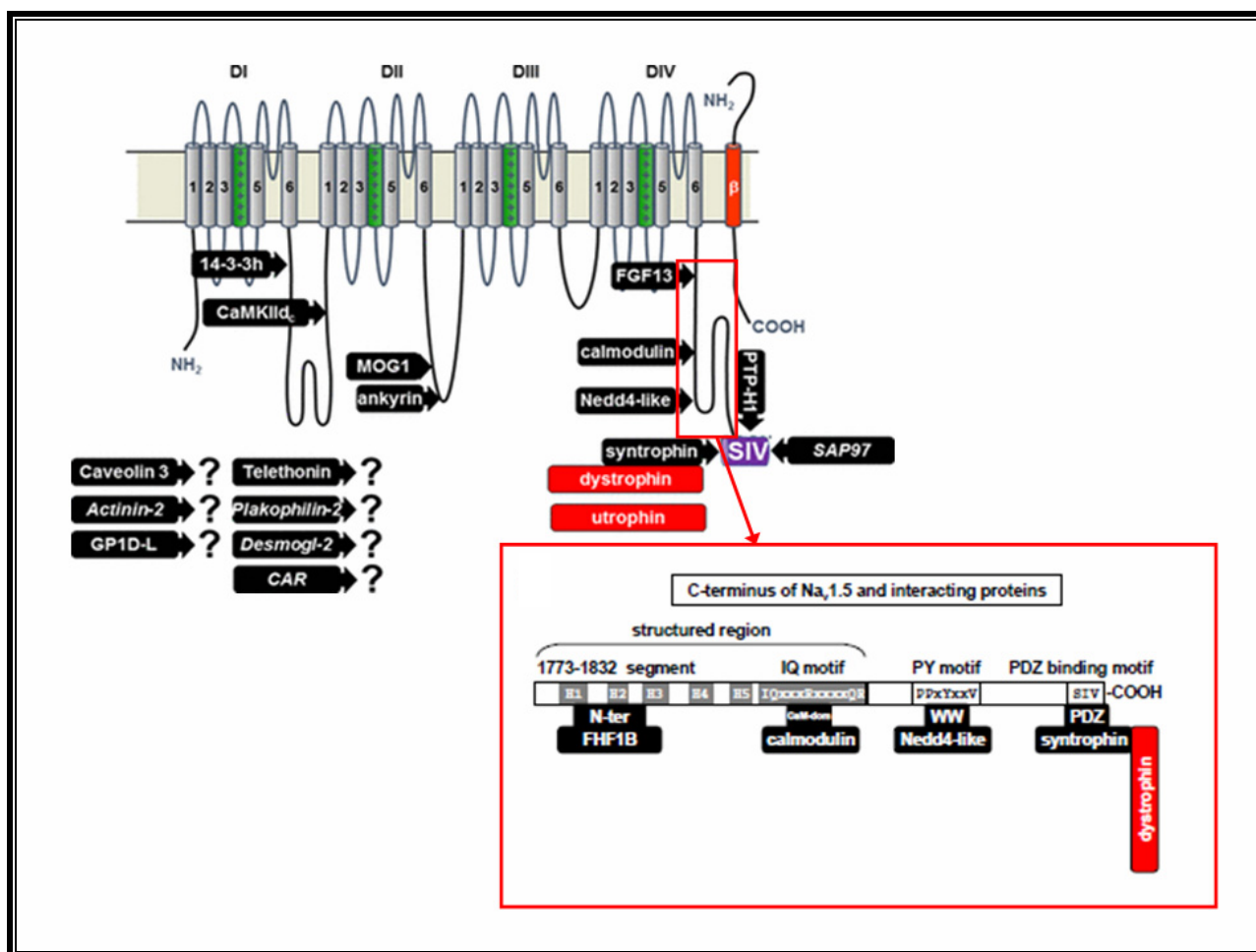


**Figura II.25.** El canal Nav1.5 genera la  $I_{Na}$  durante el potencial de acción cardiaco. (A) Potencial de acción ventricular en función del tiempo y (B) la  $I_{Na}$  correspondiente en función del tiempo. La “window current” está señalada en verde. (C) Porcentaje de canales disponibles (azul) y activados (rojo) en función del potencial de membrana. La “window current” (indicada en verde) se genera a potenciales en los cuales la activación e inactivación se solapan. [Adaptada de Veerman y cols., 2015]

### 4.3. Regulación de los canales Nav1.5 por proteínas y modificaciones post-traduccionales

Dada la importancia de los canales de sodio dependientes de voltaje en la generación del PA cardiaco la regulación del canal por proteínas accesorias tiene una importancia crítica. Los canales iónicos cardiacos existen no simplemente como unidades que forman un poro sino como parte de un complejo multiproteico amplio, diverso y dinámico denominado *canalosome* (ver apartado 5) (Figura II.26). Recientemente, las mutaciones en las proteínas y enzimas accesorias que forman parte de los canalosomes se empiezan a asociar a síndromes arritmogénicos hereditarios. En estos casos, los canales iónicos están estructuralmente intactos pero tienen la función alterada y/o expresión alterada, lo que pone la importancia de las funciones biológicas de estas macroestructuras. Las proteínas accesorias están implicadas en el tráfico, la regulación de la actividad del canal, su correcta localización celular o/y en su degradación. En cada uno de estos procesos parece que los canales interactúan con varias de estas proteínas accesorias que pueden variar según de cual se trate. De hecho, varios estudios recientes sugieren que el canal Nav1.5 forma parte de varios complejos multiproteicos localizados en distintas regiones celulares. A día de hoy se conocen más de 20 proteínas que interactúan directamente con el canal Nav1.5 desde su

biosíntesis hasta su degradación, sin contar las que interaccionan de manera indirecta. A continuación se describen las proteínas accesorias más importantes (Figura II.26).



**Figura II.26. Topografía del canal Nav1.5 y las proteínas que interaccionan con el mismo con su sitio de unión.** Las proteínas con punto de interrogación tienen un sitio de unión desconocido. CAR es el receptor del adenovirus y coxsackievirus. Sólo se representa 1 de las 4 unidades  $\beta$  (en rojo). SIV representa el dominio de unión a PDZ. **(Recuadro rojo).** Esquema de la región C-terminal del canal Nav1.5 y proteínas que interaccionan con la misma. Se ha propuesto que la parte proximal (región estructurada) tiene seis  $\alpha$  hélices (partes en gris H1–H5 y el dominio IQ) (Cormier et al. 2002). La parte distal no parece estar estructurada. Se han descrito cuatro regiones implicadas en interacción con proteínas. El N-terminal de FH1FB interacciona con la parte proximal del dominio C-terminal. La CaM, Nedd4, y sintrofina (a su vez unida a la distrofina) se unen a regiones especificadas en el esquema [Adaptadas de Abriel y Kass, 2005 y Abriel y cols., 2015].

- Proteínas con dominio PDZ (apartado detallado en parte 5.6)

### Sintrofinas

La sintrofina es la responsable de la unión de los canales Nav1.5 a la membrana lateral de los cardiomiocitos. De hecho, los canales que se encuentran en dicha localización del miocito cardiaco forman una población específica encargada de la conducción lateral del impulso cardiaco.

## Introducción

### *Distrofinas*

Esta proteína, que forma parte del complejo asociado a distrofina (DAPC), juega un papel estructural muy importante ya que enlaza el citoesqueleto con la matriz extracelular al unir su N-terminal a la actina y su C-terminal al complejo glicoproteico del sarcolema (Ehmsen y cols., 2002).

### *Proteínas MAGUK (SAP97 y CASK)*

SAP97 es una proteína que presenta un dominio análogo a la guanilato kinasa (GUK) por lo cual pertenece a la familia MAGUK (*membrane-associated guanilate kinase*). SAP97 se expresa de forma abundante en el miocardio, especialmente a nivel de los discos intercalares y túbulos T donde interacciona con Nav1.5 (Petitprez y cols., 2011; Abriel y cols., 2015).

Otra proteína de la familia MAGUK que interacciona directamente con el C-terminal del canal Nav1.5 es CASK (*Calcium/Calmodulin-dependent Serine Kinase*).

- Anquirinas

Las anquirinas son una familia de proteínas adaptadoras intracelulares que organizan, transportan y anclan proteínas de membrana al citoesqueleto de actina/espectrina, creando de esta manera microdominios dentro de las membranas con distintas propiedades funcionales (Mohler y cols., 2004; Cunha y Mohler, 2006).

- Proteínas desmosomales

La placofilina-2 (PKP2) es un componente esencial de los desmosomas cardiacos y se encuentra asociado a Nav1.5 en los discos intercalares, en un complejo junto a anquirina G y la conexina 43 (Cx43) (Sato y cols., 2011).

- Caveolina-3

La caveolina-3 (Cav3) es la isoforma predominante en el corazón y sirve tanto de proteína de anclaje a las caveolas como de regulación para señalización.

- Proteínas Cinasas y Fosfatasas

El canal Nav1.5 posee secuencias consenso de unión a la proteína cinasa A (PKA), la proteína cinasa C (PKC) y la Calcio-Calmodulina Cinasa II (CamKII).

Los efectos de la PKA sobre la  $I_{Na}$  son objeto de debate, algunos estudios describen una inhibición de la corriente, mientras otros un aumento de la misma, quizás debido a diferencias metodológicas (Sunami y cols., 1991; Zhou y cols., 2002, respectivamente). Lo que sí parece es que

la PKA fosforila las serinas S525 y S528 del canal Nav1.5 (Zhou y cols., 2002). El lazo citoplasmático entre los DI y II del canal Nav1.5 contiene varias señales de retención en el retículo endoplásmico (RE) del tipo RXR (dónde un residuo cualquiera X está flanqueado por dos argininas R) (479RKR481, 533RRR535 y 659RQR661), siendo el dominio más importante para la retención el 533RRR535. La PKA al fosforilar los residuos S525 y S528, enmascara este dominio de retención, permitiendo un aumento en la salida del RE hacia membrana de canales, produciendo un incremento de la  $I_{Na}$  (Zhou y cols., 2002).

La PKC fosforila la S1503 de Nav1.5, disminuyendo la probabilidad de apertura del canal por estabilizarlo en el estado inactivo inhibiendo la  $I_{Na}$  (Tateyama y cols., 2003; Scheuer, 2011).

Hay pocos estudios respecto a los efectos de la fosforilación de tirosinas. Dos proteínas de la familia Src, la cinasa Fyn y la fosfatasa PTPH1, fosforilan y desfosforilan respectivamente a Nav1.5 modulando principalmente las características de la inactivación del canal. La tirosina fosforilada por Fyn es la Y1495 (situada en el lazo citoplasmático entre los DIII y IV del canal) y la diana de la PTPH1 parece ser el dominio de unión a PDZ (C-terminal) (Rook y cols., 2012).

Respecto a la CamKII, los resultados son contradictorios, pudiendo achacar la disparidad a diferencias entre especies, sistemas de expresión, procedimientos electrofisiológicos, o isoformas de las proteínas utilizadas en los diferentes trabajos. Cabe la posibilidad, sin embargo, de que reflejen la existencia de más de un mecanismo regulatorio dependiente de calcio para el canal Nav1.5. Sin embargo, la combinación de los resultados definen claramente al  $Ca^{2+}$ , a la CaM, y a la CaMKII como reguladores de Nav1.5 (Rook y cols., 2012). Hace menos de un año se publicó un mapa de la fosforilación de residuos de Nav1.5 por CaMKII en células HEK293, demostrando que esta cinasa es capaz de fosforilar *in vitro* diversas serinas y treoninas principalmente situadas en el extremo N-terminal, en el primer lazo intracelular y en el extremo C-terminal del canal Nav1.5 humano (Herren y cols., 2015).

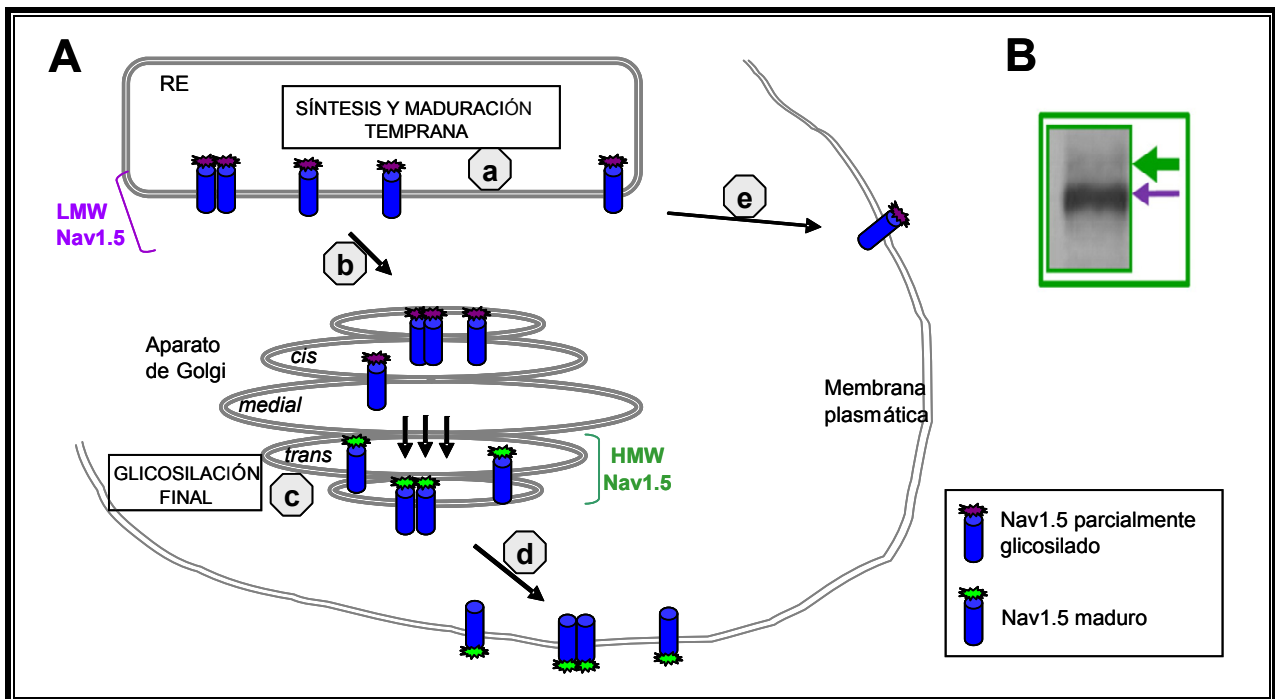
- Ubiquitinación

La ubiquitinación está relacionada con la internalización de proteínas de membrana. Las enzimas de la familia Nedd4 son las encargadas de incorporar una o más moléculas de ubiquitina a las proteínas a las que se unen. Como ya hemos comentado, en concreto es el dominio PY del canal Nav1.5 en el C-terminal el que interacciona con el cuarto dominio rico en triptófanos (WW) de la enzima Nedd4-2 (Figura II.26) (Henry y cols., 2003; Rougier y cols., 2005). Estudios utilizando brefeldina A (BFA), compuesto que inhibe el tráfico del RE al Golgi, y coexpresando Nedd4-2 demostraron una disminución de la  $I_{Na}$  debido a un aumento en la internalización del canal (Rougier y cols., 2005). La proteína chaperona  $\alpha$ B-Cristalina también está implicada en la ubiquitinación e

internalización del canal Nav1.5, mediante interacción directa tanto con el canal como con la enzima Nedd4-2 funcionalmente activa (Huang y cols., 2016). La vía de degradación de proteínas ubiquitinadas es el proteosoma. Se ha descrito que la inhibición del proteosoma mediante MG132 (MG132 inhibe la ubiquitinación) recupera el contenido de proteína Nav1.5 y la amplitud de la  $I_{Na}$  en miocitos de ratones deficientes en distrofina mientras que no las modifica en los ratones WT (Rougier y cols., 2013). Estos resultados sugieren que el proteosoma contribuye específicamente a la degradación de canales Nav1.5 en ausencia de distrofina.

- Glicosilación

Si bien la isoforma cardíaca está mucho menos glicosilada que las isoformas neuronales (13 kDa de carbohidratos en Nav1.5 vs 50-60 kDa en las neuronales) (Cohen y Levitt, 1993), parece que el canal en las aurículas está más glicosilado que en los ventrículos, lo que sugiere que hay un proceso de maduración cámara-específico (Arakel y cols., 2014). Además un estudio reciente



**Figura II.27. Modelo hipotético de la maduración y tráfico de canales Nav1.5 nativos (según Mercier y cols., 2015).** (A) Después de su síntesis los canales Nav1.5 se localizan en el interior del RE donde se completa el primer paso de la N-glicosilación (a), generando canales Nav1.5 (azul) de bajo peso molecular (LMW, *low molecular weight*). Después, los canales de LMW glicosilados son transportados al aparato de Golgi (b) donde se añaden o modifican los N-glicanos (c), este proceso de glicosilación final confiere resistencia a la digestión por Endo-H y generan los canales maduros de alto peso molecular (HMW, *high molecular weight*). Por último, los canales trafican a membrana donde son funcionales (d), los canales Nav1.5 pueden tener múltiples destinos dependiendo del contexto de la expresión. Por otro lado, los canales Nav1.5, después de alcanzar el estado glicosilado inmaduro en el RE, podrían utilizar una ruta de tráfico alternativa insensible a BFA, por lo que estarían en membrana en su formas LMW (e). (B) Imagen de western blot donde se aprecian las dos bandas de glicosilación del canal Nav1.5. La flecha superior verde marca la forma HMW y la flecha inferior morada marca la forma LMW [Adaptado de Mercier y cols., 2015].

sugiere que los canales Nav1.5 se expresan en la membrana plasmática de los miocitos cardiacos en dos formas maduras distintas, una forma totalmente glicosilada y funcional que alcanzaría la membrana por la ruta de maduración tradicional (RE-Golgi-membrana) y otra forma parcialmente glicosilada (no funcional o parcialmente funcional) que alcanzaría la membrana mediante una ruta no convencional independiente de Golgi (Mercier y cols., 2015) (Figura II.27).

Una posible explicación para tal fenómeno sería que la N-glicosilación temprana (en RE) sería suficiente para el tráfico hacia la superficie celular de los canales Nav1.5, aunque la adición de más N-glicanos y modificaciones postraduccionales en el aparato de Golgi (presumiblemente en el *trans*) serían requeridas para la funcionalidad del canal.

- Proteína 14-3-3

Los miembros de la familia 14-3-3 son proteínas adaptadoras citosólicas diméricas (Morrison, 2009). Entre otras muchas funciones, estas proteínas se unen y regulan el tráfico de varias proteínas de membrana (Mrowiek y Schwappach, 2006). Mediante experimentos de coimmunoprecipitación se demostró que 14-3-3 $\eta$  interacciona con la parte N-terminal del lazo citoplasmático entre los DI y DII del canal Nav1.5 (Allouis y cols., 2006), lo que sugería que esta proteína podría enmascarar las secuencias de retención en el retículo RXR presentes en dicho lazo (ver proteínas cinasas y fosfatas de este mismo apartado) y permitir su tráfico hacia la membrana. Sin embargo al coexpresar Nav1.5 y 14-3-3 $\eta$  en células COS (“*CV-1 in Origin with SV40 genes*”) no se observó ninguna influencia de la proteína adaptadora en la densidad de la  $I_{Na}$ , lo que sugería que esta proteína no estaba modificando el tráfico del canal. Sin embargo, la coexpresión con 14-3-3 desplazaba la curva de inactivación de Nav1.5 hacia potenciales más negativos y retrasaba la reactivación, poniendo de manifiesto que las 14-3-3 son capaces de modificar las propiedades biofísicas del canal (Allouis y cols., 2006). Además, se vio que 14-3-3 y Nav1.5 colocalizaban específicamente en los discos intercalares de miocitos (Allouis y cols., 2006).

- Factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs)

Algunos factores de crecimiento de fibroblastos como el FGF12, FGF13 o FGF14 se unen al C-terminal de Nav1.5 modulando las propiedades del canal. Por ejemplo, la coexpresión de FGF12 (también denominado FHF1B) con el canal Nav1.5 en células HEK293 produce un desplazamiento significativo hacia potenciales más negativos de la curva de inactivación del canal (Liu y cols., 2003). Se ha descubierto que determinados pacientes con SBr poseen una mutación con pérdida de función en FGF12 (p.Q7R). La proteína mutada reduce el pico de  $I_{Na}$  lo que podría explicar el SBr

en los pacientes con dicha mutación, y añadiría un gen más a la lista de genes susceptibles de generar SBr (Hennessey y cols., 2013). Por otro lado, la coexpresión de FGF14 con Nav1.5 en células HEK293 produce una disminución del pico de  $I_{Na}$  y un desplazamiento de la curva de inactivación (Lou y cols., 2005). Además, se ha demostrado que el silenciamiento de FGF13 en miocitos ventriculares de ratón produce una disminución en la densidad de la  $I_{Na}$  y una menor velocidad de conducción en monocapas de miocitos (Wang y cols., 2011).

- MOG1 (*Multicopy suppressor of gsp-1*)

MOG1 regula el tráfico nuclear proteico (Baker y cols., 2001). MOG1 y Nav1.5 coinmunoprecipitan y colocalizan en los discos intercalares, produciéndose la unión de ambas proteínas a través del lazo intracelular entre los DII y III del canal Nav1.5 (Wu y cols., 2008). Se conocen mutaciones en *RANGRF*, gen que codifica para MOG1, asociadas a SBr, como la p.E83D, que produce una inhibición de la  $I_{Na}$  debido al tráfico deficiente del canal hacia la membrana plasmática (Kattygnarath y cols., 2011). Se ha demostrado que la inhibición de MOG1 reduce la expresión en la membrana de Nav1.5, reduciendo la  $I_{Na}$ . Por el contrario, la sobreexpresión de esta proteína es capaz de “rescatar” el tráfico deficiente de varios mutantes de Nav1.5 asociados a SBr (Kattygnarath y cols., 2011; Chakrabarti y cols., 2013), lo cual posiciona a esta proteína como posible diana para el tratamiento de determinados pacientes con SBr.

- Proteína similar a Deshidrogenasa Glicerol-3-Fosfato (GPD1-L)

La GPD1-L interacciona con el canal Nav1.5 aunque se desconocen los determinantes moleculares de tal interacción (Valdivia y cols., 2009). Diversas mutaciones de pérdida de función en el gen que codifica para esta proteína se han asociado a SBr y a muerte súbita del recién nacido, pues conllevan una disminución significativa de la  $I_{Na}$  (London y cols., 2007; Van Norstrand y cols., 2007). Se ha propuesto que dicha disminución podría ser debida a que la pérdida de función de la GPD1-L mutante llevaría a un aumento de la fosforilación de Nav1.5 dependiente de PKC (en particular del residuo S1503) (Valdivia y cols., 2009).

- Regulación por micro ARNs

Los micro ARNs (miRNAs) son pequeñas moléculas de ARN de unos 22 nucleótidos de longitud que regulan la expresión del ARN mensajero (ARNm) complementario (Ambros, 2004; Bartel, 2004). Estudios electrofisiológicos en células HL-1 demuestran la regulación del canal de

$\text{Na}^+$  cardiaco por diversos miRNAs a nivel post transcripcional; en concreto miR-219 aumenta la expresión de Nav1.5 lo que conlleva un incremento de la  $I_{\text{Na}}$  (Daimi y cols., 2015).

- Dinamitina

La dinamitina forma parte del complejo multiproteico de la dinactina cuya función principal es formar un brazo articulado al que se unen proteínas para ser transportadas por los microtúbulos. La dinactina tiene dos dominios estructurales: un dominio similar a actina, al que se unen las proteínas para ser transportadas, conectado por la dinamitina a otro dominio que interacciona con los microtúbulos (Schroer, 2004; Berezuk y Schroer, 2007). Cuando se sobreexpresa la dinamitina, se produce un desacoplamiento del complejo y se inhibe el transporte. Se ha demostrado que la dinactina regula tanto el transporte anterógrado, regulando las kinesinas (Deacon y cols., 2003; Berezuk y Schroer, 2007), como el retrógrado vía dineínas (Vallee y cols., 2004; Haghnia y cols., 2007). La sobreexpresión de la dinamitina producen una disminución de canales Nav1.5 en membrana indicando que cuando el tráfico vía dinactina está inhibido, el tráfico anterógrado de los canales Nav1.5 se ve afectado (Chatin y cols., 2014). Además, la dinamitina se une a través de su C-terminal al DI intracelular del canal Nav1.5 y ambas colocalizan en los discos intercalares en miocitos de ratón (Chatin y cols., 2014).

#### 4.4. Canalopatías asociadas a los canales de $\text{Na}^+$ cardiacos

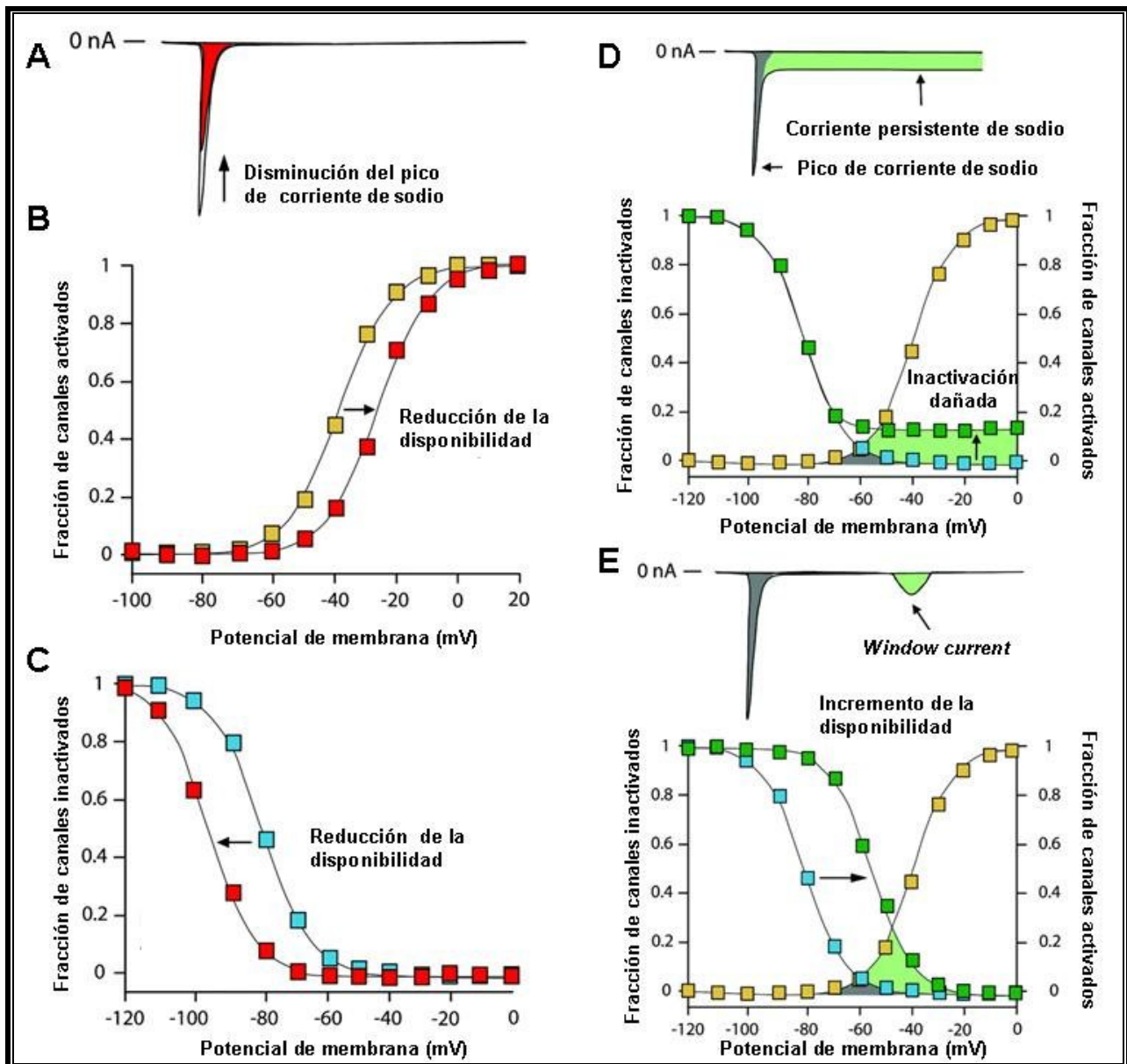
La importancia de los canales de  $\text{Na}^+$  se pone de manifiesto en la existencia de diferentes enfermedades causadas por mutaciones (se conocen más de 100) en los genes que los codifican, entre las que se encuentran numerosas enfermedades que afectan a la función nerviosa o a la contracción del músculo esquelético y/o cardiaco (Cannon y cols., 1991; Wallace y cols., 1998; Moric y cols., 2003; George, 2005).

A nivel cardiaco, las mutaciones en el gen *SCN5A* se han relacionado con la aparición de arritmias [SQTL, SBr, FA] y/o con defectos en la conducción intracardiaca y fenotipos mixtos (Wang y cols., 1995; Chen y cols., 1998; Schott y cols., 1999; Wei y cols., 1999; Veldkamp y cols., 2000; Tan y cols., 2001; Grant y cols., 2002; Darbar y cols., 2008; Wilde y Postema, 2015) (Tabla II.6). Las patologías asociadas a alteraciones, tanto de estructura como de función, de canales iónicos se denominan *canalopatías*. La prevalencia de canalopatías cardiacas en la población es difícil de evaluar pero se estima que son responsables de aproximadamente la mitad de las muertes súbitas cardiacas (Behr y cols., 2008).

| Patología   | Características clínicas  | Alteraciones en $I_{Na}$                                   | Alteraciones en el ECG   |
|---|---|--|--|
| SQTL  | Taquiarritmias ventriculares (TdP)<br>Fibrilación ventricular<br>Síncope<br>Paro cardíaco   | ↑ disponibilidad del canal<br><br>Inactivación ralentizada | QT prolongado  |
| SBr   | Fibrilación ventricular<br>Muerte súbita cardíaca   | ↓ $I_{Na}$ ,   | Elevación segmento ST en (V1–V3)<br>↑ duración del PQ y QRS (con un intervalo QT normal)   |
| Síndrome del seno enfermo (SSE)                                 | Bradicardia sinusal<br>Bloqueo seno-auricular<br>Paro sinusal<br>Alteración de la conducción en el nódulo SA y AV<br>Taquiarritmias auriculares | ↓ $I_{Na}$   | Ritmo cardíaco irregular o pausas > 2 s<br>Alternancia del ritmo cardíaco acelerado/lento (taquicardia/bradicardia)  |
| Enfermedad progresiva del sistema de conducción cardíaca (DCCP) | Bloqueo senoauricular, bloqueo AV, bloqueo infrahisiano y bloqueo de rama derecha o izquierda intervalo QT.                                     | ↓ $I_{Na}$   | Marcada prolongación de la onda P y del intervalo PR<br>Ensanchamiento QRS sin elevación del segmento ST o prolongación del intervalo QT   |
| Cardiomiopatía dilatada   | Defectos estructurales y arritmias (McNair y cols., 2011)   | ↑ o ↓ $I_{Na}$   | ECG variados<br>Onda P bifásica<br>Depresión del segmento ST y onda T invertida<br>Bloqueo de rama izquierda o derecha<br>Desviación del eje a la izquierda<br>Bigeminismo ventricular |

**Tabla II.6. Principales patologías cardíacas asociadas a alteraciones en el gen *SCN5A*.** ↑ aumento; ↓ disminución; TdP, Torsade de Pointes; SA, senoauricular; AV, auricoventricular [Adaptado de *Detta y cols., 2015*].

Parte de la variabilidad clínica observada es el resultado directo de los efectos de las mutaciones en las propiedades biofísicas y tráfico del canal Nav1.5. Estos efectos se suelen dividir en ganancia o pérdida de función del canal (es decir, aumento o disminución de la  $I_{Na}$ , respectivamente) (Figura II.28). La ganancia de función se puede deber a un aumento en la  $I_{Na, L}$  (entrada persistente de  $Na^+$  en la fase de meseta del PA), a la inactivación incompleta, o a un aumento de la corriente *window* por un desplazamiento de la curva de inactivación a potenciales más despolarizados (Figura II.28 D y E). El aumento de  $Na^+$  produce un aumento de la DPA y por tanto una prolongación del intervalo QT, dando lugar a la aparición de SQTL tipo 3 (Figura II.29C). Por el contrario, las mutaciones que producen una pérdida de función del canal Nav1.5 disminuyen el pico de la  $I_{Na}$ , desplazan la curva



**Figura II.28. Mecanismos que llevan a la reducción del pico de  $I_{Na}$  (A) o al aumento de la  $I_{Na,L}$  (D).** Hay dos mecanismos que conducen a la disminución del pico de  $I_{Na}$ : (B) el desplazamiento de la dependencia de voltaje de la activación hacia potenciales de membrana más despolarizados o, (C) un desplazamiento hacia potenciales más negativos de la dependencia de voltaje de la curva de inactivación. La disminución del pico de corriente a un potencial de membrana dado se debe a que hay menos canales de sodio disponibles. Ambos mecanismos han sido descritos para mutaciones de *SCN5A* asociadas a SBr. Hay dos mecanismos que conducen al incremento de la  $I_{Na,L}$ : un fallo en la inactivación (por ejemplo, los canales no se inactivan completamente) (D) o un incremento en la “window current” (E) debido a un desplazamiento de la inactivación hacia potenciales más despolarizados, incrementando dicha “window current”. [Adaptada de Wilde y Brugada, 2011].

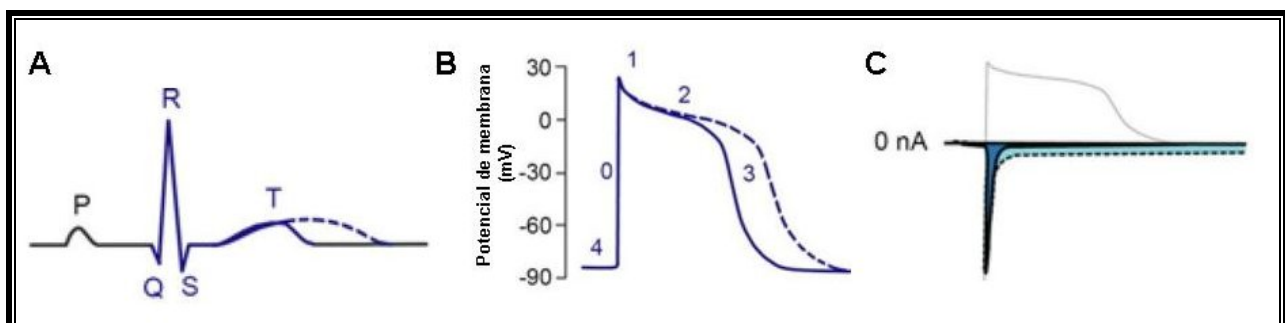
de activación a potenciales de membrana más despolarizados, o producen una inactivación del canal más rápida o a potenciales más hiperpolarizados (Figura II.28 A, B y C). Estas mutaciones son responsables del SBr, el SSE, y el DCCP. Algunas mutaciones de *SCN5A* se asocian a la fibrilación auricular familiar o generan fenotipos mixtos (síndromes solapados). Estas últimas pueden producir simultáneamente un aumento en la  $I_{Na,L}$  y una reducción del pico de la  $I_{Na}$ , siendo

por tanto ganancia y pérdida de función a la vez (Bezzina y cols., 1999). Los pacientes portadores de mutaciones que dan lugar a síndromes solapados pueden presentar características electrocardiográficas tanto de SQTL tipo 3 con una prolongación del intervalo QT como de SBr con elevación del segmento ST en las derivaciones  $V_1$  a  $V_3$  simultáneamente. En otros casos lo que ocurre es que diferentes miembros de la familia portadores de la mutación presentan fenotipos distintos. Este es el caso de la mutación p.D1816VfsX7 identificada en una amplia familia española en la que los diversos portadores presentaban fenotipos que iban desde la fibrilación ventricular idiopática, hasta la FA, los defectos de conducción o el SBr (Dolz y cols., 2013).

- Síndrome de QT largo

El SQTL se caracteriza por una marcada prolongación del intervalo QT del ECG consecuencia de la prolongación la DPA a nivel ventricular. Estas alteraciones de la repolarización que pueden producir la aparición de taquicardias ventriculares polimórficas, *Torsades de Pointes* (TdP), fibrilación ventricular (FV) y muerte súbita (Figura II.29) (Ackerman y Clapham, 1997). Habitualmente, el SQTL presenta una herencia autosómica dominante (síndrome de Romano-Ward), aunque también existe una variante autosómica recesiva (síndrome de Jervell y Lange-Nielsen) (Ackerman, 2004).

El SQTL hereditario se divide en 15 tipos descritos hasta la fecha, cada uno relacionado con una alteración genética concreta (SQTL1 a SQTL15) (Schwartz, 2006; Amin y cols., 2013; Nakano y Shimizu, 2016) (Tabla II.7). Se conocen más de 250 mutaciones asociadas tanto a *SCN5A* como a proteínas accesorias. El SQTL1, SQTL2 y SQTL3 son los tipos más frecuentes, de los cuales, el SQTL3 (10% de los casos) es el único asociado a mutaciones en el gen que codifica para la subunidad cardiaca (*SCN5A*) (Roberts, 2006).



**Figura II.29. Actividad eléctrica cardiaca y SQTL asociado al incremento de  $I_{Na,L}$ .** (A) Prolongación del intervalo QT en un ECG de superficie. (B) Prolongación de la DPA debido al aumento de la duración de la fase 2. (C) Incremento de la  $I_{Na,L}$  (azul claro) que puede llevar asociado un SQTL 3, 9, 10 ó 12. [Adaptadas de Amin y cols., 2013]

Las mutaciones descritas hasta ahora responsables del SQT3 (Wang y cols., 1995; Splawski y cols., 2000; George, 2005; Napolitano y cols., 2006) producen una ganancia de función del canal de  $\text{Na}^+$  o una modificación del acoplamiento activación-inactivación de la inactivación y/o de la deactivación del canal (Figura II.28D y E). El resultado es un aumento de la  $I_{\text{Na}}$  durante la fase de meseta del PA ( $I_{\text{Na,L}}$ ) (Figura II.29C) que, aunque es de amplitud muy pequeña ( $\approx 0.5\text{-}2\%$  respecto a la amplitud máxima de la  $I_{\text{Na}}$ ), es suficiente para producir la prolongación de la DPA (Bennett y cols., 1995; Dumaine y cols., 1996; Tamargo, 2000). Es frecuente que en estos pacientes las arritmias se desencadenen cuando están descansando o durmiendo a diferencia de los SQT1 y 2 que se manifiestan en el ejercicio (especialmente nadar) o bajo estrés emocional respectivamente (Schwartz, 2006).

| SQTL                             | Gen                | Proteína                | Corriente  |
|----------------------------------|--------------------|-------------------------|--|
| Síndrome Romano–Ward             |                    |                         |  |
| LQT1                             | <i>KCNQ1</i>       | Kv7.1                   | $I_{\text{Ks}} \downarrow$                       |
| LQT2                             | <i>KCNH2</i>       | KV11.1                  | $I_{\text{Kr}} \downarrow$                       |
| LQT3                             | <i>SCN5A</i>       | Nav1.5                  | $I_{\text{Na}} \uparrow$                         |
| LQT4                             | <i>Anquirina-B</i> | Anquirina-B             | $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPasa                  |
| LQT5                             | <i>KCNE1</i>       | MinK                    | $I_{\text{Ks}} \downarrow$                       |
| LQT6                             | <i>KCNE2</i>       | MiRP1                   | $I_{\text{Kr}} \downarrow$                       |
| LQT7                             | <i>KCNJ2</i>       | Kir2.1                  | $I_{\text{K1}} \downarrow$                       |
| LQT8                             | <i>CACNA1C</i>     | CaV1.2                  | $I_{\text{Ca-L}} \uparrow$                       |
| LQT9                             | <i>CAV3</i>        | Caveolina3              | $I_{\text{Na}} \uparrow$                         |
| LQT10                            | <i>SCN4B</i>       | Subunidad SCN $\beta$ 4 | $I_{\text{Na}} \uparrow$                         |
| LQT11                            | <i>AKAP-9</i>      | Yotiao                  | $I_{\text{Ks}} \downarrow$                       |
| LQT12                            | <i>SNTA1</i>       | Sintrofina- $\alpha$ 1  | $I_{\text{Na}} \downarrow$                       |
| LQT13                            | <i>KCNJ5</i>       | Kir3.4                  | $I_{\text{KACH}} \downarrow$                     |
| LQT14                            | <i>CALM1</i>       | Calmodulina1            | Alteración en la ruta de señalización del calcio |
| LQT15                            | <i>CALM2</i>       | Calmodulina2            |  |
| Síndrome Jervell y Lange–Nielsen |                    |                         |  |
| JLN1                             | <i>KCNQ1</i>       | Kv7.1                   | $I_{\text{Ks}} \downarrow$                       |
| JLN2                             | <i>KCNE1</i>       | MinK                    | $I_{\text{Ks}} \downarrow$                       |

**Tabla II.7. Bases genéticas del SQT3.**  $\uparrow$  aumento;  $\downarrow$  disminución [Adaptada de Nakano y Shimizu, 2016]

Además, se han descrito mutaciones en genes distintos al *SCN5A* que también tienen como consecuencia un aumento de la  $I_{Na,L}$  y que se han relacionado con el SQT. Estas mutaciones afectan a los genes que codifican proteínas accesorias del canal Nav1.5 como la caveolina 3 (SQT9) (Vatta y cols., 2006), la subunidad auxiliar Nav $\beta$ 4 (SQT10) (Medeiros-Domingo y cols., 2007) y la  $\alpha$ 1-sintrofina (SQT12) (Ueda y cols., 2008; Wu y cols., 2008).

Por último, se ha identificado un polimorfismo (p.S1102Y) que aparece con mayor prevalencia en la población afroamericana asociado con un aumento de la densidad de la  $I_{Na,L}$  tras la administración de diferentes fármacos (Splawski y cols., 2002). Esta prolongación del intervalo QT producida por la administración de fármacos se denomina “SQT adquirido”.

El tratamiento farmacológico depende del tipo de SQT del paciente. La mexiletina es especialmente efectiva en pacientes con mutaciones en *SCN5A* que dan lugar a canales con la inactivación retrasada (Ruan y cols., 2007; Mazzanti y cols., 2016), aunque a altas dosis, es proarrítmica. Los beta-bloqueantes son los fármacos de elección para el tratamiento del SQT1 y 2, pero en el tipo 3 son menos efectivos (Schwartz y cols., 2001; Bankston y Kass, 2010). La ranolazina ha demostrado ser efectiva tanto para el SQT3 como para la FA ya que disminuye el pico máximo de la  $I_{Na}$ , pero en particular, inhibe la  $I_{Na,L}$  en miocitos auriculares (Antzelevitch y cols., 2011). Sin embargo también inhibe las corrientes de  $I_K$  e  $I_{Ca,L}$ , por lo que tiene algunos efectos secundarios (Antzelevitch y cols., 2011). El tratamiento de los pacientes de alto riesgo es el desfibrilador cardioversor implantable (DCI) (Priori y cols., 2013).

- Síndrome de Brugada

Las mutaciones que producen pérdida de función responsables del SBr reducen la  $I_{Na}$  como resultado de la síntesis de proteínas no funcionales, fallos en el tráfico a membrana de la proteína sintetizada o una inactivación acelerada del canal (Figura II.28A, B y C) (Grant, 2009). El resultado final es un acortamiento de la DPA en el tejido epicárdico y el aumento de la heterogeneidad de la repolarización ventricular y del riesgo de sufrir FV (Brugada y Brugada, 1992; Antzelevitch, 2001) (Figura II.30). Se discute sin embargo, si la alteración en la repolarización es consecuencia de un retraso en la excitación transmural cardiaca consecuencia, a su vez, de la disminución en la excitabilidad cardiaca producida por la disminución de la  $I_{Na}$ .

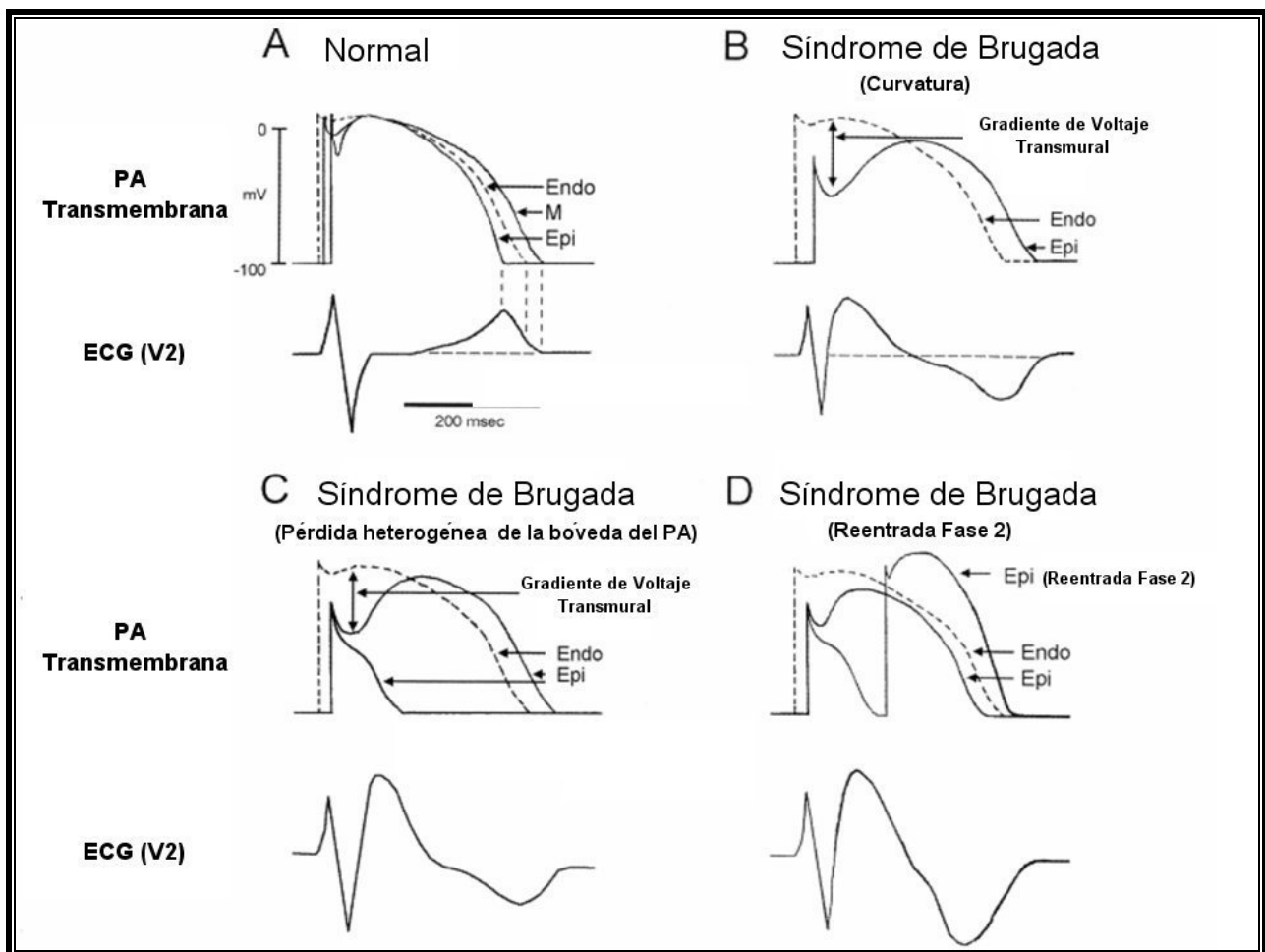
El SBr se caracteriza por un bloqueo de rama derecha, la elevación del segmento ST en las derivaciones  $V_1$  a  $V_3$  del ECG y muerte súbita en pacientes con un corazón estructuralmente normal. Es más común en hombres que mujeres (debido a diferencias intrínsecas en la expresión de canales entre mujeres y hombres –mayor densidad de  $I_{to}$  en hombres- o debido a diferencias

hormonales) (Antzelevitch, 2006; Shimizu y cols., 2007). En algunos pacientes, la fiebre (algunas mutaciones generan canales cuya pérdida de función es mayor al aumentar la temperatura) (Keller y cols., 2005) desenmascara un ECG característico de SBr y desencadena arritmias fatales (Amin y cols., 2008).

Hay pacientes en los que los dos alelos del gen *SCN5A* están mutados (heterocigosis compuesta). Nuestro grupo describió el caso de un paciente portador de una mutación en uno de los alelos de *SCN5A* que codifica la mutación p.G1748D que genera canales con profundos defectos de *gating* que además prácticamente no trafican a la membrana, lo cual daba lugar a una reducción del pico de la  $I_{Na}$  de un 90% (Núñez y cols., 2013). En el otro alelo, el paciente portaba otra mutación que en este caso codificaba para los canales p.D1690N que aunque no presentaban marcados defectos en el *gating* tampoco eran capaces de alcanzar correctamente la membrana plasmática. Cuando se estudiaron los efectos de la coexpresión de cada una de estos mutantes con canales WT (p.D1690N+WT: p.G1748D+WT) se observó que las corrientes generadas en ambos casos eran significativamente inferiores al 50% de la corriente generada por canales WT solos (Núñez y cols., 2013). Es decir ambos mutantes actúan como “proteínas venenosas” que son capaces de disminuir la función y la expresión de las proteínas sanas, es lo que se denomina en genética, como ya hemos mencionado, EDN (Sottas y Abriel, 2016). La “haploinsuficiencia”, al contrario que el EDN, implica que la proteína mutada no se expresa y/o funciona no interfiriendo sin embargo con las proteínas WT (Herskowitz, 1987).

Hace aproximadamente 10 años, durante la investigación de una mutación identificada en un paciente con SBr, se demostró que al cotransfectar en células HEK293 los canales Nav1.5 mutantes (p.L325R) con los WT en proporción 0.5:0.5 (puesto que la mutación aparecía en heterocigosis en el paciente), la corriente generada ( $I_{Nav1.5}$ ) estaba exageradamente reducida en comparación con la generada en células transfectadas únicamente con la subunidad  $\alpha$  WT (1) (Keller y cols., 2005). Se demostró posteriormente que la disminución de la  $I_{Na}$  no era debida a una mayor degradación de canales Nav1.5 WT, como se había descrito para canales de calcio (Mezghrani y cols., 2008), ya que utilizando un inhibidor del proteosoma (MG132) el nivel de disminución era similar (Mercier y cols., 2012). Este hallazgo fue la primera demostración de que un mutante de Nav1.5 podía producir EDN, cosa, que hasta la fecha, se había demostrado sólo en canales multiméricos como los de  $K^+$ . Más aún, los resultados implicaban que las subunidades  $\alpha$ -Nav1.5, a pesar de que *per se* son capaces de generar canales funcionales, interaccionan entre sí, bien en la membrana celular formando agregados, o bien en alguno de los procesos de síntesis, tráfico a membrana, y reciclaje que sufren los canales durante su ciclo biológico. Posteriormente, diferentes estudios confirmaron que otras mutaciones que producen la pérdida de función de los canales Nav1.5 también producen

EDN (Clatot y cols., 2012; Mercier y cols., 2012; Núñez y cols., 2013). Posteriormente se ha demostrado que las subunidades  $\alpha$ -Nav1.5 pueden coimmunoprecipitar, siendo la primera evidencia bioquímica de que existe de la interacción entre subunidades en la membrana citoplasmática (Clatot y cols., 2012). De hecho para que se produzca el tráfico hacia la membrana de los canales Nav1.5 sintetizados es necesario que en el RE se produzca la interacción entre subunidades  $\alpha$  a través de su dominio N-terminal (Clatot y cols., 2012; Abriel y Sottas, 2014). Si bien estos datos sugieren que los canales de  $\text{Na}^+$  se multimerizan, todavía se desconoce la estequiometría, la localización, y los determinantes



**Figura II.30. Representación esquemática de los hipotéticos cambios en el PA ventricular derecho epicárdico responsables de las manifestaciones electrocardiográfica del SBr.** Modelo desarrollado por Antzelevitch para explicar el SBr como una alteración en la repolarización. En el epicardio cuando la  $I_{\text{Na}}$  se reduce, hay un cambio en la forma del PA que se manifiesta como una elevación en el ST y una onda T negativa, produciéndose una prolongación en el PA epicárdico, siendo la duración de éste más larga que la de los PAs del endocardio (A) y (B). Sumado a ésta reducción de la  $I_{\text{Na}}$ , la  $I_{\text{to}}$  repolariza la membrana más allá del voltaje al que los canales de calcio tipo L son activados, resultando en la pérdida de la fase de meseta del PA. Esta pérdida es heterogénea, generando una dispersión epicárdica de la repolarización (C). Tal dispersión permite la reentrada en fase 2, causando un impulso prematuro, que puede generar FV como consecuencia de la reentrada transmural del extrasístole (D). [Adaptadas de Antzelevitch, 2003]

moleculares responsables de este fenómeno, aunque parece que la subunidad  $\beta 1$  es fundamental (Mercier y cols., 2012). En último término implican que probablemente varios canales Nav1.5 están agrupados en cada canalosoma.

Otras mutaciones del canal Nav1.5 que aparecen en heterocigosis no producen EDN. Es el caso de la mutación por desplazamiento del marco de lectura p.D1816VfsX7 que genera una proteína truncada sin los 200 últimos aminoácidos del canal (extremo C-terminal) (Dolz-Gaitón y cols., 2013). También se han descrito mutaciones que, a diferencia de las mencionadas anteriormente, se localizan en el dominio N-terminal del canal y producen EDN (p.R104W y p.R121W) (Clatot y cols., 2012). Estos datos indican que la aparición de EDN no está ligada exclusivamente a la presencia de las mutaciones en el DIV y C-terminal del canal.

Aunque la subunidad Nav1.5 es la principal responsable de la  $I_{Na}$  cardiaca, se desconoce en gran parte el papel que juegan en el miocardio otras subunidades  $\alpha$  del canal de sodio (Tabla II.8). Aunque inicialmente se propuso que la subunidad Nav1.8 sólo estaba presente en neuronas intracardiacas (Verkerk y cols., 2012), se han descrito diversas mutaciones en el gen *SCNA10*, que codifica el canal Nav1.8, asociadas al SBr (Hu y cols., 2014). Por un lado se demostró que Nav1.5 y Nav1.8 son capaces de interactuar entre sí y por otro se observó que los mutantes de Nav1.8 son

| Gen                              | Frecuencia | Anormalidades funcionales | Gen                          | Frecuencia | Anormalidades funcionales   |
|----------------------------------|------------|---------------------------|------------------------------|------------|-----------------------------|
| Disfunción en canal de $Na^+$    |            |                           | Disfunción en canal de $K^+$ |            |                             |
| <i>SCN5A</i>                     | 20–30%     | $I_{Na}\downarrow$        | <i>HCN4</i>                  | Rara       | $I_K\uparrow$               |
| <i>SCN10A</i>                    | Rara       | $I_{Na}\downarrow$        | <i>KCNE3</i>                 | Rara       | $I_K\uparrow$               |
| <i>SCN1B</i>                     | Rara       | $I_{Na}\downarrow$        | <i>KCNE5</i>                 | Rara       | $I_K\uparrow$               |
| <i>SCN2B</i>                     | Rara       | $I_{Na}\downarrow$        | <i>KCND3</i>                 | Rara       | $I_K\uparrow$               |
| <i>SCN3B</i>                     | Rara       | $I_{Na}\downarrow$        | <i>ABCC9</i>                 | Rara       | $I_K\uparrow$               |
| <i>GPD1L</i>                     | Rara       | $I_{Na}\downarrow$        | <i>KCNJ8</i>                 | Rara       | $I_K\uparrow$               |
| <i>MOG1</i>                      | Rara       | $I_{Na}\downarrow$        | <i>KCNH2</i>                 | Rara       | $I_K\uparrow$               |
| <i>SLMAP</i>                     | Rara       | $I_{Na}\downarrow$        | <i>PKP2</i>                  | Rara       | $I_K\uparrow$               |
| <i>PKP2</i>                      | Rara       | $I_{Na}\downarrow$        |                              |            |                             |
|                                  |            |                           |                              | Otros      |                             |
| Disfunción en canal de $Ca^{2+}$ |            |                           | <i>TPRM4</i>                 | Rara       | Potencial de reposo anormal |
| <i>CACNA1C</i>                   | 1–3%       | $I_{Ca}\downarrow$        |                              |            |                             |
| <i>CACNB2</i>                    | 1–3%       | $I_{Ca}\downarrow$        |                              |            |                             |
| <i>CACNA2D1</i>                  | 1–3%       | $I_{Ca}\downarrow$        |                              |            |                             |

**Tabla II.8. Bases genéticas del SBr.**  $\uparrow$  aumento;  $\downarrow$  disminución [Adaptada de Watanabe y Minamino, 2016]

capaces de ejercer un EDN sobre la  $I_{Na}$  generada por Nav1.5, lo que explicaría el SBr en aquellos pacientes portadores de dichas mutaciones.

Además en pacientes con diversas miotonías es frecuente la identificación de mutaciones en el gen *SCN4A* que codifica para Nav1.4, cuya expresión mayoritaria es en músculo esquelético. Estos pacientes presentan manifestaciones cardíacas similares a las del SBr y, *viceversa*, hay pacientes con SBr que presentan miotonías (Bissay y cols., 2016). Esta relación entre canalopatías del músculo esquelético y cardíacas asociadas a canales de  $Na^+$  deberá ser estudiada en el futuro.

Otras proteínas accesorias del canal de  $Na^+$  en las que se han descrito mutaciones que se han asociado al SBr son (Tabla II.8): la GPD1-L (*Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase 1-Like*) (London y cols., 2007; Van Norstrand y cols., 2007), las subunidades auxiliares Nav $\beta$ 1 (Watanabe y cols., 2008), Nav $\beta$ 2 (Riuró y cols., 2013) y Nav $\beta$ 3 (Hu y cols., 2009), MOG1 (Kattygnarath y cols., 2011), la SLMAP (Sarcolemmal membrana-associated protein) (Ishikawa y cols., 2012) y la PKP2 (Plakophilin-2) (Cerrone y cols., 2014).

Como se puede observar en la Tabla II.8 el SBr se asocia en otros pacientes a mutaciones que producen bien el aumento de la corriente generada por diversos canales de  $K^+$  o bien la disminución de la corriente de calcio tipo L (Watanabe y Minamino, 2016).

El tratamiento de los pacientes con SBr mediante fármacos (isoprotenerol), ablación por radiofrecuencia o bien implantando un DCI es la única estrategia capaz de prevenir la muerte súbita (Priori y cols., 2013).

- Síndrome del seno enfermo (SSE) (o Síndrome Congénito del Nodo del Seno)

Este síndrome engloba varias formas de arritmias que pueden ser transitorias (por ejemplo la bradicardia sinusal o la parada sinusal) y son debidas a un mal funcionamiento del nodo SA. En algunos casos el SSE congénito aparece en pacientes muy sintomáticos y generalmente jóvenes que son portadores de mutaciones de pérdida de función en el gen *SCN5A* (Figura II.28A, B y C) (Benson y cols., 2003).

- Enfermedad progresiva del sistema de conducción cardíaca (PCCD)

La PCCD (también llamado enfermedad de Lev-Lenègre) se manifiesta como una prolongación progresiva de los parámetros de conducción (onda P, PR y QRS), y bloqueo de rama derecha o izquierda, sin elevación del segmento ST ni prolongación del intervalo QT. Al igual que el SSE, la forma genética de la PCCD se asocia a mutaciones de pérdida de función en el gen *SCN5A*. De hecho, una sola mutación en *SCN5A* puede producir PCCD aislada o combinada con SBr (Kyndt y cols., 2001; Smits y cols., 2005).

- Cardiomiopatía dilatada

La cardiomiopatía dilatada se caracteriza por una dilatación de las cámaras cardíacas que conduce a alteraciones de la contractilidad y a arritmias ventriculares que desencadenan la muerte súbita del paciente (Detta y cols., 2015). Las causas son muy variadas, pero aproximadamente en el 50% de los casos son idiopáticas. De este 50%, un 20% son casos hereditarios genéticamente determinados (Fatkin, 2011; Detta y cols., 2015). Aunque la implicación de mutaciones en *SCN5A* en la enfermedad es controvertida (Groenewegen y cols., 2005; McNair y cols., 2004; McNair y cols., 2011), se han descrito casos asociados a diversas mutaciones de pérdida de función que dan lugar a canales con alteraciones de *gating* (McNair y cols., 2004). Curiosamente, en la mayoría de los casos estos pacientes presentan otras manifestaciones eléctricas simultáneamente (FA, flutter auricular, bloqueo auricoventricular, taquicardia ventricular y/o FV).

- FA

La FA es una taquiarritmia caracterizada por una activación descoordinada y muy rápida (>350 latidos por minuto) de las aurículas (Nattel, 2002; Fuster y cols., 2006). Es la arritmia cardíaca de mayor prevalencia en la población general (1-2%) y afecta generalmente a pacientes con cardiopatías diversas pero también aparece en gente joven con corazones aparentemente sanos. Los estudios poblacionales sugieren que la FA presenta un componente genético importante. Se han descrito mutaciones tanto de pérdida de función en el gen *SCN5A* (p. ej. p.D1275N y p.N1986K) (Olson y cols., 2005; Ellinor y cols., 2008), *SCN1B* (p. ej. p.R85H y p.D153N) y *SCN2B* (p. ej. p.R28Q) (Watanabe y cols., 2009) como de ganancia de función en el gen *SCN5A* (p. ej. p.M1875T) (Li y cols., 2009) (Figura II.28). Estos resultados apoyan la hipótesis de que la disminución o el aumento de la  $I_{Na}$  podrían aumentar la susceptibilidad a la FA: un aumento de la  $I_{Na}$  podría inducir actividad desencadenada y estabilizar los rotores auriculares de alta frecuencia (Kneller y cols., 2005), mientras que la inhibición de la  $I_{Na}$  acortaría la DPA y reduciría la velocidad de conducción y la excitabilidad auriculares, lo que acortaría la longitud de onda del circuito de reentrada y desestabilizaría los rotores de alta frecuencia (Kneller y cols., 2005).

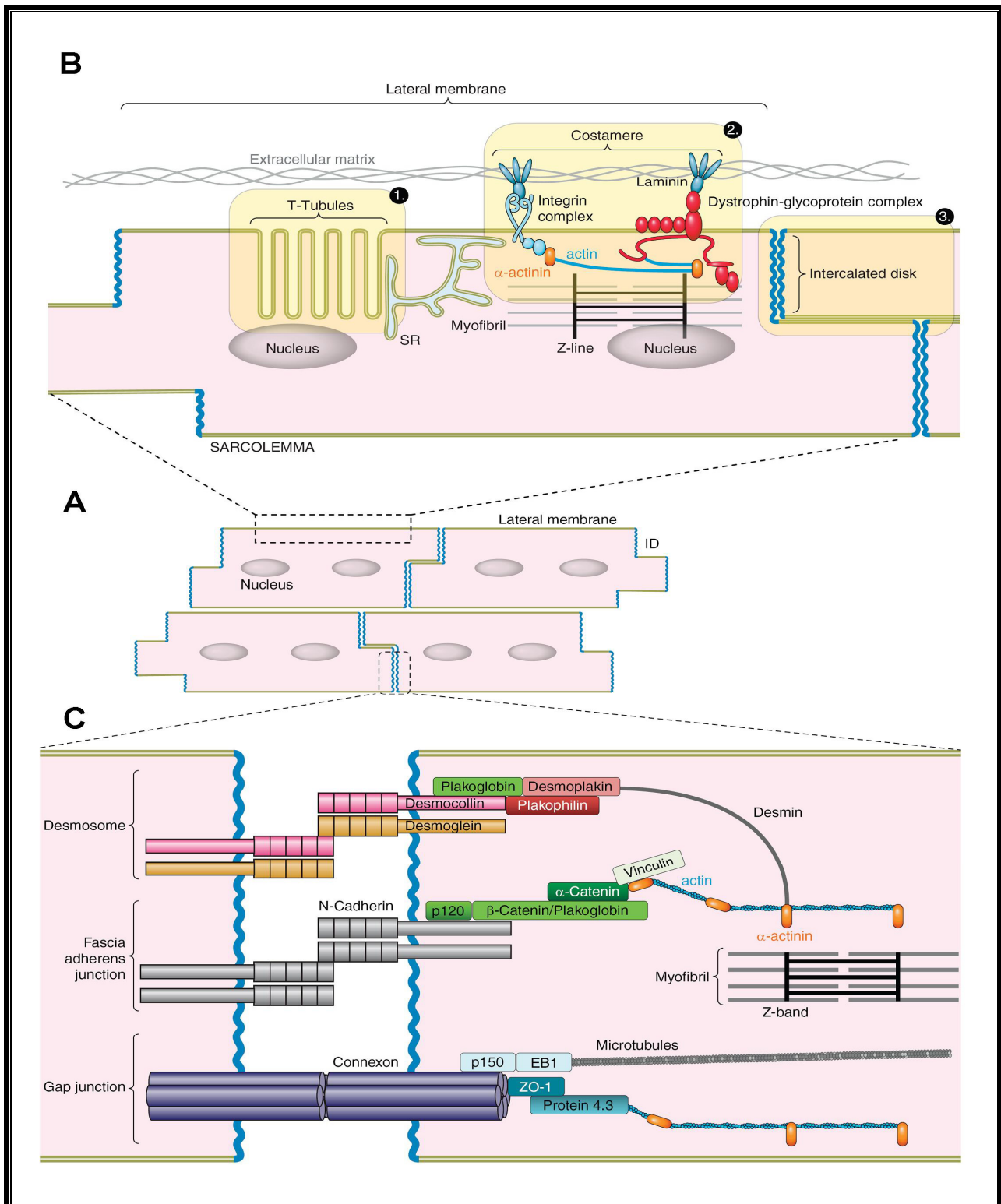
- Otras canalopatías

Por último, se han descrito otras mutaciones que afectan al canal de  $Na^+$  y que se asocian con la muerte súbita del recién nacido (Arnestad y cols., 2007) o el síndrome de repolarización temprana (SRT) tipo 6 (Watanabe y cols., 2011; Antzelevitch, 2012).

## 5. CANALOSOMAS EN CARDIOMIOCITOS

### 5.1. Polaridad celular en cardiomiocitos

Debido a las características funcionales y estructurales del corazón, hay ciertas especificidades en los miocitos cardiacos que no se comparten con otras células. Los miocitos son células muy diferenciadas especializadas en el acoplamiento excitación-contracción (EC). Tienen por tanto mecanismos eléctricos y mecánicos muy desarrollados. Los distintos dominios funcionales son a) túbulos-T, que son invaginaciones tubulares de la membrana lateral, b) el resto de la membrana lateral, también denominada costámero o crestas, y c) los discos intercalares donde están las uniones célula-célula (Figura II.31). Los miocitos forman auténticos dominios estructurales y funcionales ya que tienen complejos iónicos macromoleculares diferentes y muy organizados. El sarcómero, la unidad funcional para la contracción, que abarca el área entre las líneas Z, está hecha de tres tipos de filamentos: finos (actina), gruesos (miosina) y elásticos (titina o conectina). Esta unidad constituye el elemento central de la arquitectura de un miocito y es responsable de su apariencia estriada debido a la alternancia de bandas A (filamentos gruesos) e I (filamentos finos). Los microtúbulos se orientan preferentemente en el eje longitudinal mientras que el citoesqueleto de actina tiene un patrón tanto longitudinal como transversal. Los miocitos cardiacos son células alargadas acopladas eléctricamente en el eje longitudinal a través de los discos intercalares, donde el PA se transmite de manera anisotrópica entre dos miocitos adyacentes. La conexión longitudinal entre los miocitos cardíacos convierte al miocardio en un sincitio funcional. Las numerosas uniones de los discos intercalares aseguran una propagación rápida y coordinada del PA a través del músculo cardíaco. Hay tres tipos de estructuras de adhesión en los discos intercalares: uniones *fascia adherens*, desmosomas, y uniones estrechas (Clark y cols., 2002) que unen proteínas intracelulares del citoesqueleto de miocitos adyacentes en el espacio extracelular. En condiciones fisiológicas, los miocitos no están acoplados en el eje transversal. Se pueden diferenciar dos estructuras en la membrana lateral, el costámero y los túbulos-T. El costámero une proteínas de los miocitos con la matriz extracelular. En concreto, dos complejos juegan un papel regulador fundamental a este nivel: el complejo integrina, que son proteínas de adhesión y mecanotransductores, y el complejo distrofina-glicoproteína, que incluye proteínas citoplasmáticas, TM y extracelulares, como distroglicanos, distrofina/sintrofina, o la distrobrevina (Lapidos y cols., 2004). Además garantiza el mantenimiento de la organización 3D del miocardio ya que detecta y transmite las fuerzas mecánicas de la sístole y la diástole y recupera la integridad celular. Por otro



**Figura II.31. Representación esquemática de los 3 subdominios especializados en miocitos cardiacos: discos intercalares (ID), costámeros en la membrana lateral y túbulos-T.** (A) Representación esquemática de la organización sincitial del miocardio. Se muestra también la polaridad de los miocitos. (B) Recuadro agrandado de la organización de proteínas en la membrana lateral, dividida en costamero y túbulos-T. (C) Recuadro ampliado de la organización de proteínas en los discos intercalares. Los miocitos son células acopladas mecánica- y eléctricamente en el eje longitudinal a través de unas estructuras especializadas: los discos intercalares, organizados en 3 subtipos estructurales: desmosomas, fascia adherens y uniones gap. La línea azul corresponde a la membrana de discos intercalares mientras que la doble línea verde representa el sarcolema. [Adaptado de Balse y cols., 2012]

lado, los túbulos-T están unidos a extensiones del retículo sarcoplásmico donde acoplado con la actividad eléctrica, se produce la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desencadenando la contracción (Balse y cols., 2012).

## 5.2. Definición de canalsoma

El concepto clásico consideraba que los canales iónicos cardiacos son complejos heteromultiméricos formados por el ensamblaje de la subunidad  $\alpha$ , que forma el poro hidrofílico, con una o más subunidades auxiliares. Sin embargo, en los últimos años se ha hecho evidente que aunque el ensamblaje de estas subunidades puede formar un canal funcional, en la mayoría de los casos, el correcto funcionamiento del mismo requiere su localización específica en una zona determinada del sarcolema, su anclaje al citoesqueleto y/o su unión a proteínas que actúan de plataformas o de anclaje (*scaffold proteins*) y que ponen en relación al canal con otros canales, receptores o enzimas. Este conjunto de proteínas constituye un "canalsoma" y representa la unidad estructural y funcional del canal iónico en la membrana.

## 5.3. Canalsomas de canales Kir2.x

La evidencia acumulada durante los últimos 20 años sugiere que los canales de Kir2.x forman parte de unos complicados complejos multiproteicos. Más aún, la expresión, tráfico, localización, y función de los mismos son regulados por interacciones con otras proteínas. Sin embargo, la información disponible acerca de las interacciones proteína-proteína en las que están involucrados los canales Kir2.x es limitada. Melnyk y cols. demostraron que Kir2.1 está localizado principalmente en los túbulos T y discos intercalares de cardiomiocitos ventriculares de perro, mientras que Kir2.3 se localiza preferentemente en túbulos T de miocitos auriculares de perro, no teniendo Kir2.1 una localización subcelular definida (Melnyk y cols., 2002). Como ya mencionamos, los canales Kir2.1-2.3 tienen un dominio de unión a proteínas con dominios PDZ (SEI en canales Kir2.1 y Kir2.2, y SAI en los Kir2.3) (Figura II.20) (Leonoudakis y cols., 2001). Leonoudakis y cols. demostraron que los canales Kir2.x cardiacos interaccionan a través del dominio de unión a PDZ con las proteínas pertenecientes la familia MAGUK SAP97, CASK, Veli-4 y Mint1. Sin embargo, la asociación de los canales Kir2.x con CASK, Veli-4, y Mint1, y su papel en células cardiacas no ha sido esclarecido. Leonoudakis y cols. demostraron también que a través del dominio de unión a PDZ los canales Kir2.x interaccionan con diversos componentes del DAPC,

incluyendo las sintrofinas  $\alpha_1$ ,  $\beta_1$ , y  $\beta_2$ , la distrofina y la distrobrevina (Leonoudakis y cols., 2001; 2004a; 2004b).

- Proteínas MAGUK

Se ha propuesto un modelo en el cual los canales Kir2.x se asocian con diferentes proteínas (SAP97, CASK, Veli, Mint1), formando diferentes complejos (Leonoudakis y cols., 2004b). Kir2.x se une al segundo dominio PDZ de SAP97 a través de su dominio de unión a PDZ C-terminal (Willis y cols., 2015). Se ha demostrado que SAP97 regula la  $I_{K1}$  modulando la expresión en superficie de los canales Kir2.x puesto que la unión a SAP97 es importante para anclar los canales Kir2.x a la membrana plasmática (Vikstrom y cols., 2009; Vaidyanathan y cols., 2010; Milstein y cols., 2012). Además, los datos sugieren que la unión de los canales Kir2.3 a SAP97 produce cambios conformacionales en la estructura del canal con la consiguiente modificación de la conductancia unitaria (Vikstrom y cols., 2009). Ha sido también demostrado que SAP97 forma parte de un complejo de señalización que incluye además del canal Kir2.1 a la PKA y al receptor adrenérgico  $\beta_1$ , por lo que SAP97 estaría implicada en la regulación  $\beta_1$ -adrenérgica de la  $I_{K1}$ . Como se ha mencionado, el sitio de unión a SAP97 en el extremo C-terminal de los canales Kir2.x (SXI) solapa con un dominio de fosforilación por PKA (RRES) (Figura II.20). Si esta serina es fosforilada, los canales Kir2.x no se unen a SAP97 (Vaidyanathan y cols., 2010).

Además, los dominios SH-3 y GUK, de SAP97 pueden interactuar con la proteína AKAP y ayudar a ensamblar quinasas y fosfatasas. Los datos sugieren que la interacción entre SAP97 y los canales Kir2.x es un proceso dinámico que puede ser regulado por el estado de fosforilación de los canales Kir2.x. Además, varios estudios sugieren que SAP97 participa activamente en la localización de los canales Kir2.1 y Kir2.2 en los túbulos T, y de Kir2.1 y Kir2.3 en los discos intercalares (Vikstrom y cols., 2009; Vaidyanathan y cols., 2010). Por lo tanto, los estudios señalados más arriba indican que SAP97 contribuye a la función y localización de los canales Kir2.x en los diferentes subdominios celulares de miocitos cardiacos.

- La caveolina 3 (Cav3)

Las caveolinas participan en la formación de microdominios lipídicos, ricos en colesterol y esfingolípidos, o *rafts* llamados caveolas (Balijepalli y Kamp, 2008). La Cav3 es la isoforma predominante en el corazón y sirve tanto de proteína de anclaje a las caveolas como de regulación para señalización. Recientemente, se ha demostrado que en los miocitos cardiacos humanos Kir2.1 puede asociarse con Cav3. De hecho, las mutaciones en el gen *CAV3* producen una disminución de

la densidad de la  $I_{K1}$ , principalmente debida a la reducción de la expresión de los canales Kir2.x en la superficie celular y se asocian al SQTl tipo 9 (Vaidyanathan y cols., 2013).

- DAPC

Los canales Kir2.x pueden interactuar con las sintrofinas  $\alpha_1$ ,  $\beta_1$ , y  $\beta_2$ , la distrofina, y la distrobrevina a través de sus respectivas secuencias de unión a dominios PDZ (Leonoudakis y cols., 2001; 2004a; 2004b; Vaidyanathan y cols., 2009). En un modelo murino de distrofia de Duchenne (*mdx*), en el que se suprime la expresión de la distrofina, se ha demostrado la disminución significativa en los niveles de proteína Kir2.1 sin que se modifiquen los niveles de ARNm en los miocitos cardiacos (Gavillet y cols., 2006). Por otro lado, en el modelo de ratón transgénico que sobreexpresa Kir2.1 la expresión de la  $\alpha$ -sintrofina, que forma parte del DAPC, aumenta significativamente a nivel miocárdico sin que se observen cambios en los niveles e expresión del ARNm. Por el contrario, en los ventrículos de ratones *Kcnj2 knockout* heterocigotos (Kir2.1<sup>-/+</sup>) la expresión de  $\alpha$ -sintrofina disminuye significativamente (Milstein y cols., 2012).

Todos los datos anteriores sugieren que en células cardiacas, el DAPC puede ser importante en la regulación de la expresión y la función de los canales Kir2.x. Es posible que las proteínas del DAPC contribuyan a determinar la localización subcelular de los canales Kir2.x en cardiomiocitos, de manera similar a lo que ha sido demostrado para los canales Nav1.5.

- Filamina A

Las filaminas son proteínas de unión a la actina que interactúan directamente con diversas proteínas y están involucradas en múltiples procesos celulares incluyendo adhesión célula-célula y célula-matriz, mecanoprotección, remodelado de la actina, y rutas de señalización intracelular (Zhou y cols., 2007 y 2010). Los datos experimentales sugieren que la filamina A interactúa con diversos canales en células cardiacas (Kir2.1 y SK2, por ejemplo) (Sampson y cols., 2003; Rafizadeh y cols., 2014). Por ejemplo, se ha demostrado que la filamina A incrementa el número de canales Kir2.1 residentes en la membrana de células del músculo liso arterial uniéndose a una región del extremo C-terminal de Kir2.1 localizada entre los aminoácidos 307 y 326 (Figura II.20). Además, la filamina A parece actuar como una proteína de anclaje al citoesqueleto de la célula para los canales Kir2.1, estabilizando su expresión en superficie y reclutándolos para llevarlos a diferentes dominios de membrana (Sampson y cols., 2003). Así, en los miocitos cardiacos, la filamina A se localiza en las líneas Z, por lo que es posible que una subpoblación de canales Kir2.x esté localizada en esta región de los miocitos como resultado de su interacción con la filamina.

En resumen, además de la densidad y propiedades biofísicas normales, los canales Kir2.x requieren una adecuada localización en subdominios macromoleculares de membrana especializados. Claramente, las características moleculares y estructurales de tales subdominios son cruciales en la regulación de los canales Kir2.x. Dado que los conocimientos en esta área son todavía limitados, se abre ante nosotros un vasto e inexplorado campo en la electrofisiología cardíaca.

#### 5.4. SAP97

SAP97 es una proteína de anclaje de la familia MAGUK que presenta 3 dominios PDZ que le permiten jugar un papel importante en el tráfico y anclaje de canales iónicos y receptores a la membrana. Tiene un peso aproximado de 97 kDa. SAP97 se expresa de forma abundante en el miocardio, especialmente a nivel de los discos intercalares y túbulos T donde interacciona con diferentes canales (Petitprez y cols., 2011; Abriel y cols., 2015; Gillet y cols., 2015).

La familia MAGUK (*membrane-associated guanilate kinase*), a la que pertenece SAP97, PSD-95 (SAP90), PSD-93 (Chapsyn 110) y SAP102, comparte la organización de dominios, caracterizada por presentar un dominio análogo a la guanilato cinasa (GUK) inactivo (Elias y cols., 2006). Además del dominio GUK, que carece de actividad enzimática, contienen 3 dominios PDZ, y una región SH3 (*Src homology 3*). SAP97 difiere de los otros miembros de la familia MAGUK en sus dos regiones de *splicing* alternativas que generan múltiples isoformas de SAP97 (Fourie y cols., 2014). Una de ellas se localiza en el dominio N-terminal antes del primer PDZ y la otra región está entre el dominio SH3 y el GUK (Figura II.32). En la región del N-terminal hay dos inserciones de *splicing*: I1A e I1B. La otra región entre SH3 y GUK contiene cuatro inserciones de *splicing*: I2, I3, I4 e I5 (Fourie y cols., 2014). Adicionalmente se diferencia entre  $\alpha$ - y  $\beta$ -SAP97 en función de la secuencia del extremo N-terminal.  $\alpha$ -SAP97 presenta 2 cisteínas palmitoiladas y  $\beta$ -SAP97 un dominio L27 mediante el cual es capaz de interactuar con otras proteínas. Las isoformas que se expresan en miocardio humano son las que presentan el dominio L27 y además las regiones I3 e I1A (I3+I1A) (926 aminoácidos) o I3 pero sin I1A (I3-I1A) (893 aminoácidos) (Godreau y cols., 2003) (Figura II.32). La existencia de numerosas isoformas de SAP97, con distintas combinaciones de inserciones de *splicing* regula su localización celular y su capacidad para multimerizar (McLaughlin y cols., 2002). El dominio SH3 interactúa con secuencias similares a PxxxPR, presente en numerosas proteínas mientras que el dominio GUK se une a proteínas de la familia GKAP/SAPAP1/DAP1 (Wu y cols., 2000). Por su lado la región N-terminal y la zona entre SH3 y GUK modula la unión de SAP97 al citoesqueleto (Wu y cols., 2000).

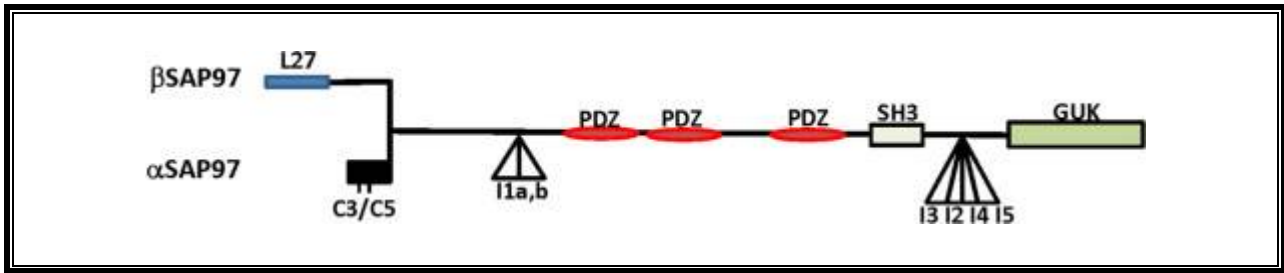


Figura II.32. Diagrama esquemático de la organización estructural de SAP97. [Adaptadas de Fourie y cols., 2014]

### 5.5. Sintrofina

Las sintrofinas son una familia de proteínas citoplasmáticas adaptadoras. Es un grupo de proteínas heterogéneo de 58 a 60 kDa caracterizado por tener un “dominio único o específico de sintrofinas” en su C-terminal (SU) que les permite dimerizarse (Peters y cols., 1997; Newey y cols., 2000). Además, presentan dos dominios homólogos a plectrina (PH), de los cuales el PH1 está “dividido”, puesto que en la parte central se encuentra un dominio PDZ que separa el PH<sub>N-term</sub> y el PH<sub>C-term</sub> (Figura II.33). La presencia de varios dominios de unión permite que las sintrofinas interaccionen simultáneamente con distintas proteínas, participando en muchos procesos celulares (Bhat y cols., 2013). Entre otros, la sintrofina ancla canales iónicos al complejo asociado a distrofina, con la cual interacciona directamente, y también sirve de unión entre la matriz extracelular y las proteínas intracelulares y el citoesqueleto mediante su interacción con la actina.

Se han identificado cinco isoformas de sintrofinas de las cuales en los cardiomiocitos de ratón sólo se han detectado tres: la  $\alpha 1$ , que es la forma ácida, y  $\beta 1$  y  $\beta 2$ , que son las formas básicas de la proteína (Albrecht y Froehner, 2002). Cada isoforma es producto de distintos genes. En los cardiomiocitos humanos la más abundante es la  $\alpha 1$  (Iwata y cols., 2015). La  $\alpha 1$ -sintrofina,

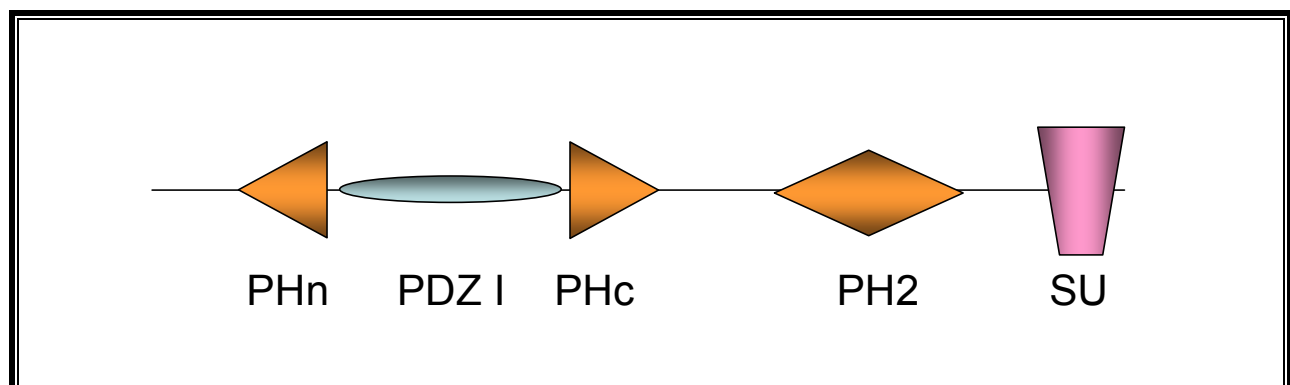


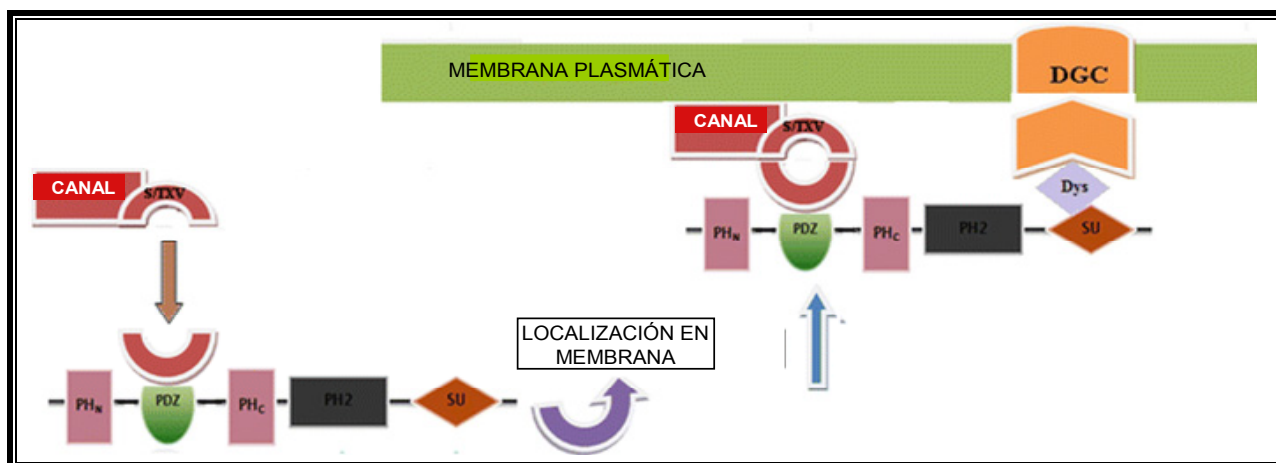
Figura II.33. Diagrama simplificado de la organización estructural de la sintrofina con la posición de los distintos dominios y las interacciones con distintas proteínas. Los aminoácidos del dominio PH1 solapan con el PDZ embebido.

codificada por el gen *SNTA1*, tiene 58 kDa, y 505 aminoácidos que provienen de un único ARNm (Bhat y cols., 2013). La isoforma  $\alpha 1$  humana tiene una homología del 94% con la del ratón y un 93% con la del conejo.

Debido a que ninguno de los dominios tiene actividad enzimática, se considera que son proteínas adaptadoras que sirven para dirigir a las proteínas diana a sus localizaciones específicas en la membrana celular.

El dominio PH1 está dividido en dos, de los cuales la parte N-terminal ( $PH_N$ ) va de los aminoácidos 1 a 77 y la C-terminal ( $PH_C$ ) del 162 al 271. Entre ambos está el dominio PDZ, estructura globular conservada de casi 80 aminoácidos. La conformación  $PH_N$ -PDZ- $PH_C$  es muy peculiar y funciona sinérgicamente en la unión de proteínas. El PH1 está especializado en anclar fosfolípidos a la membrana y en la transducción de señales lipídicas (Chockalingam y cols., 1999) y también se une a CaM de manera  $Ca^{2+}$ -independiente (Jing y cols., 2005). La mitad  $PH_N$  se compone de tres láminas  $\beta$  y una  $\alpha$ -hélice C-terminal. El dominio PDZ, que consiste en siete láminas  $\beta$  y dos  $\alpha$ -hélice, se inserta en el lazo entre la  $\beta 3$  y  $\beta 4$  de  $PH_N$ , de manera que el tándem  $PH_N$ -PDZ- $PH_C$  funciona como una estructura única (Jing y cols., 2005). El dominio PDZ se encarga de anclar numerosas proteínas, canales, receptores, etc., a la membrana (Bhat y cols., 2013) (Figura II.34).

El dominio PH2, que abarca del aminoácido 281 al 406, se une a numerosos lípidos/proteínas para anclarlos en membrana, entre otros el fosfoinositol (PI3) (Lemmon y cols., 2000). Junto al dominio SU, son responsables de la unión de la sintrofina con la distrofina, utrofina y distrobrevina (Figura II.34).



**Figura II.34.** Participación de la sintrofina en la localización en membrana de canales iónicos. [Adaptado de Bhat y cols., 2013]

## 5.6. Dominios PDZ

Los dominios PDZ, cuyo nombre deriva de las tres primeras proteínas en donde fueron identificados [*Post synaptic density protein* (PSD95), *Drosophila disc large tumor suppressor* (Dlg1), y *Zonula occludens-1 protein* (zo-1)] (Kennedy, 1995), son secuencias de aproximadamente 80-90 aminoácidos que poseen determinadas proteínas de anclaje que permiten interacciones proteína-proteína, jugando un papel fundamental en la organización de complejos proteicos y en la señalización celular (Lee y Zheng, 2010; Ivarsson, 2012). El reconocimiento y unión de una secuencia lineal situada en el extremo C-terminal de diversas proteínas (incluidos varios canales iónicos y receptores TM) es la función típica de los dominios PDZ, pero el repertorio funcional de estos módulos es más versátil pues también incluye reconocimiento de secuencias internas, dimerización y unión a fosfolípidos (Ponting, 1997; Ivarsson, 2012). La afinidad de los dominios PDZ por su ligando puede ser modificada por diversos medios como cambios en el pH, efectos alostéricos o fosforilación de los dominios PDZ o de los ligandos, lo cual sitúa a estos dominios como reguladores dinámicos de la señalización celular (Lee y Zheng, 2010; Ivarsson, 2012). La interacción es a menudo promiscua, de tal forma que un dominio PDZ normalmente reconoce varios ligandos y un mismo ligando puede ser reconocido por diferentes dominios PDZ (Harris y Lim, 2001).

Además, la plasticidad de las interacciones de los dominios PDZ se refleja en que la especificidad de éstas puede cambiarse debido a mutaciones tanto en los ligandos como en los dominios PDZ, lo que probablemente ha permitido la “reprogramación” de las interacciones PDZ-ligando durante la evolución (Reina y cols., 2002; Stiffler y cols., 2007; Tonikian y cols., 2008; Ernst y cols., 2010).

### 5.6.1. Estructura de los dominios PDZ

Los dominios PDZ consisten en secuencias de aproximadamente 80-90 aminoácidos que adquieren la estructura secundaria de 5 a 6 hebras- $\beta$  y 2 hélices- $\alpha$  que a su vez se pliegan formando una estructura globular con una topología  $\beta A-\beta B-\beta C-\alpha A-\beta D-\beta E-\alpha B-\beta F$  (Figura II.35 y II.36). Estos dominios se asemejan a un sándwich formado por las 6 hebras- $\beta$  que generan dos láminas- $\beta$ , con una de estas hebras ( $\beta D$ ) participando en la formación de ambas láminas- $\beta$ . El ligando (péptido) se une al dominio PDZ en una hendidura hidrofóbica que se genera entre la hebra  $\beta B$  y la hélice  $\alpha B$ , orientadas de manera antiparalela a  $\beta B$ . Asimismo, el lazo que conecta las hebras  $\beta A$  y  $\beta B$  que

contiene normalmente la secuencia Gly-Leu-Gly-Phe (GLGF) también juega un papel fundamental en la unión del ligando (Figura II.36). Como podemos observar en el alineamiento de secuencias de diversos dominios PDZ de la Figura II.35, hay una serie de aminoácidos altamente conservados (gris), debido a razones funcionales, que intervienen en la interacción con el ligando como son el dominio GLGF (lazo entre  $\beta$ A y  $\beta$ B, R/K-XXX- G- $\Phi$ -G- $\Phi$ , donde X es cualquier aminoácido y  $\Phi$  un residuo hidrofóbico), la hebra  $\beta$ B o la histidina de la hélice- $\alpha$  B.

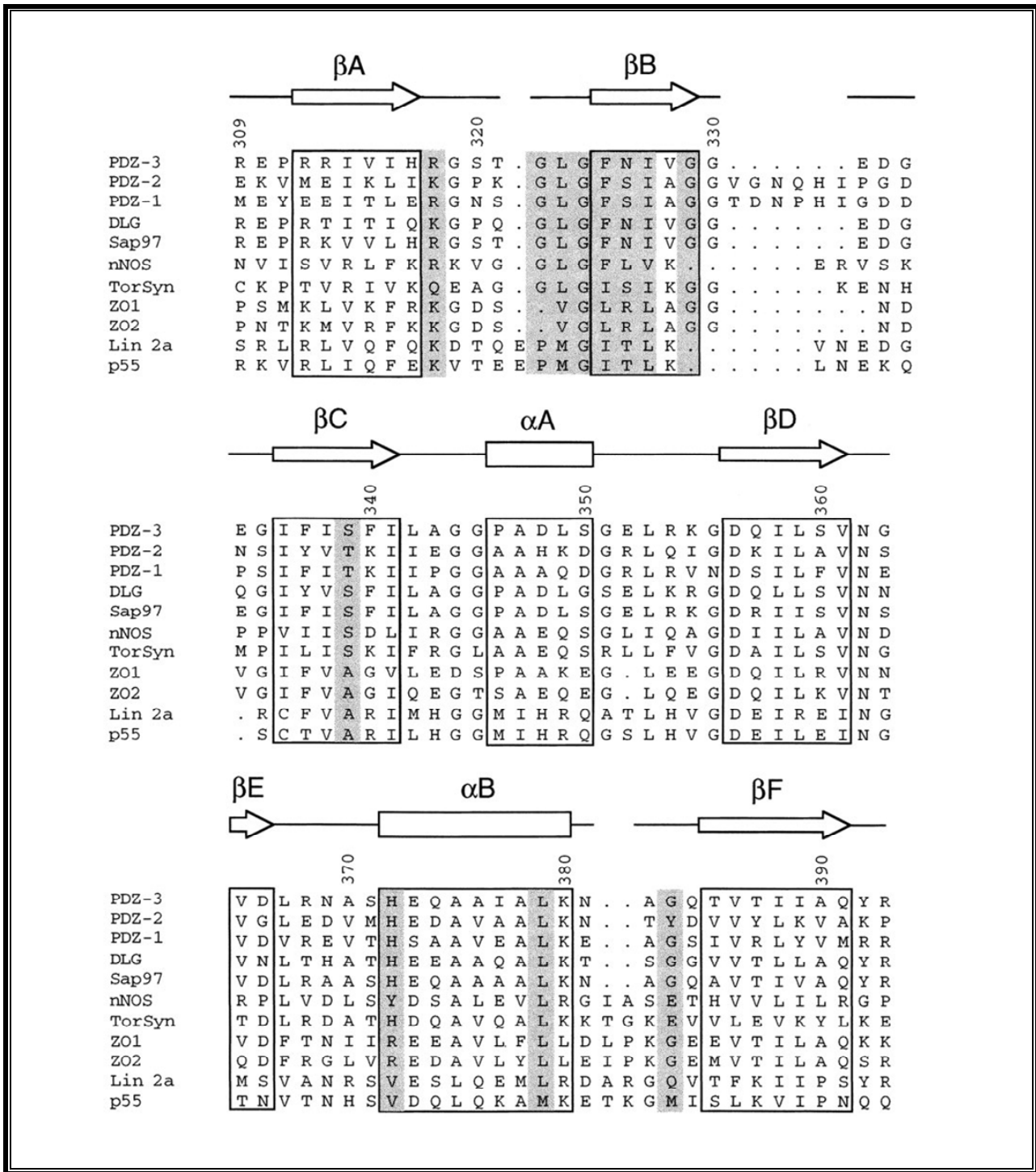
### 5.6.2. Tipos de interacciones con dominios PDZ

- Reconocimiento y unión a secuencia C-terminal

La interacción PDZ más conocida es aquella que se produce gracias al reconocimiento de proteínas (normalmente canales iónicos o receptores de membrana) que poseen residuos hidrofóbicos en su extremo C-terminal (Songyang y cols., 1997). La secuencia C-terminal del ligando se une al lazo de unión al grupo carboxilo o dominio GLGF y el péptido (extremo C-terminal del ligando) se une como una hebra- $\beta$  adicional en el bolsillo hidrofóbico que hay entre  $\beta$ B y  $\alpha$ B siendo los últimos 4 aminoácidos de la secuencia de unión a dominios PDZ los más importantes para el reconocimiento (Figura II.36) (Doyle y cols., 1996; Daniels y cols., 1998; Tonikian y cols., 2008; Ivarsson, 2012). Se han descrito también ciertas desviaciones de esta forma canónica de unión en estudios estructurales de la sintenina-1 o la tamalina, en donde se demostró que los péptidos C-terminales se unen de forma perpendicular únicamente a través de los dos últimos aminoácidos.

Los dominios PDZ fueron al principio divididos en tres clases dependiendo de la secuencia de los últimos aminoácidos del C-terminal del ligando a la que se unen: a) clase I, siendo la más típica de todas, uniéndose a péptidos con una secuencia X-(T/S)-X- $\Phi$ -COOH, b) clase II que se unen a péptidos con una secuencia X- $\Phi$ -X- $\Phi$ -COOH, c) clase III (la más atípica) que se unen a péptidos con una secuencia X-(D/E)-X- $\Phi$ -COOH (Stricker y cols., 1997; Songyang y cols., 1997). Aunque esta clasificación es una simplificación, puesto que se han llegado a proponer hasta 16 tipos diferentes de dominios PDZ basados en la unión al ligando (Stiffler y cols., 2007; Tonikian y cols., 2008).

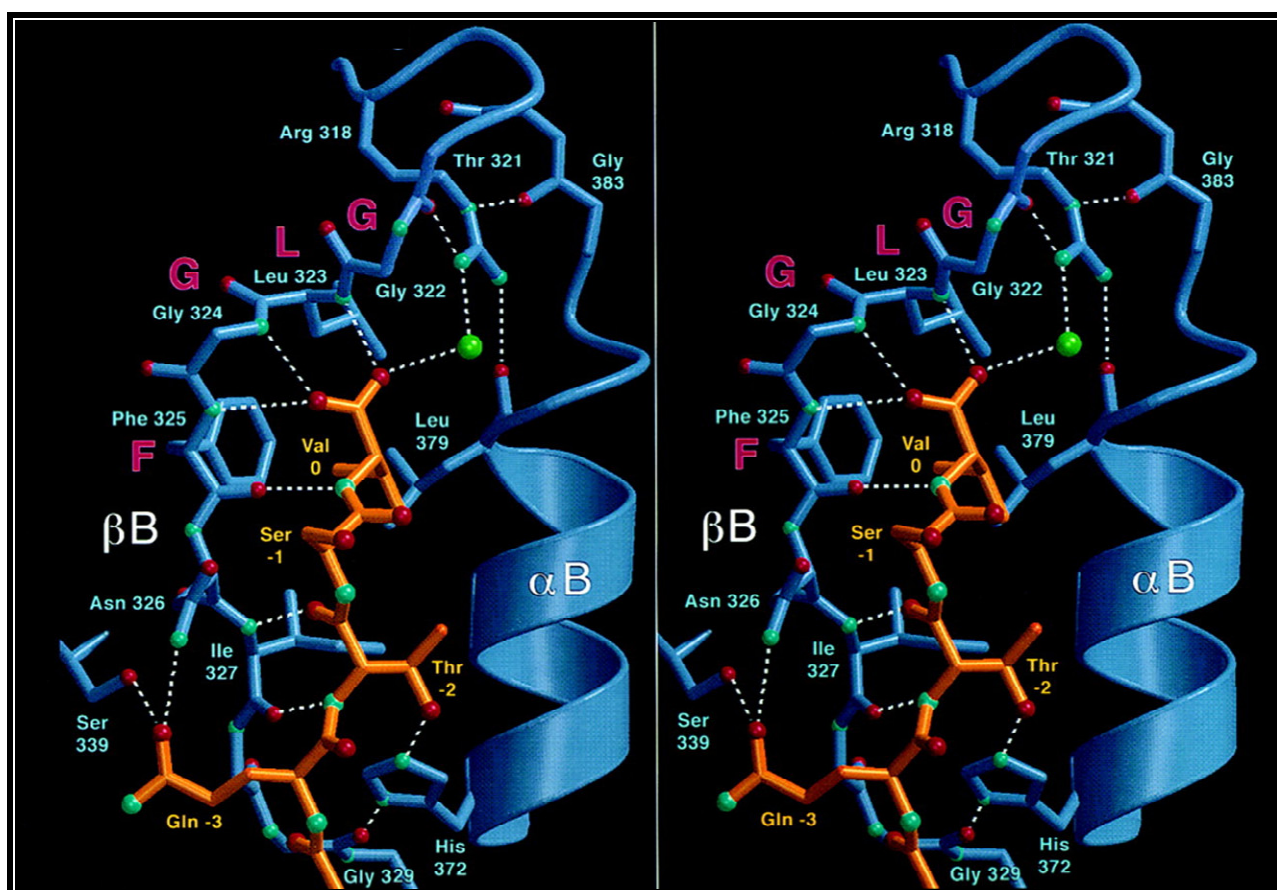
En la Figura II.36 se puede observar la unión del dominio PDZ3 de PSD-95 (clase I) a su ligando, donde el último aminoácido de la secuencia de unión a PDZ se denota como 0 (p.0), el



**Figura II.35. Alineamiento de secuencias de diversos dominios PDZ y su estructura secundaria.** Los elementos de estructura secundaria de los dominios PDZ se muestran arriba de las secuencias como flechas (hebras- $\beta$ ), barras (hélice- $\alpha$ ), y líneas (lazos conectores). Los residuos que interaccionan con el ligando en el complejo PDZ-ligando se muestran en gris. El numerado de los aminoácidos corresponde a la secuencia del tercer dominio PDZ de PSD-95 (rata). Las secuencias son las siguientes: PDZ-3 (residuos 309-393 que corresponden al tercer dominio PDZ de PSD-95), PDZ-2 (residuos 156-246 que corresponden al segundo dominio PDZ de PSD-95), PDZ-1 (residuos 61-151 que corresponden al primer dominio PDZ de PSD-95), DLG (*Drosophila*) (residuos 482-566 que corresponden al tercer dominio PDZ de DLG), SAP97 (residuos 461-545 que corresponden al tercer dominio PDZ de SAP97 en rata), nNOS (residuos 12-100 que corresponden al dominio PDZ de nNOS), TorSyn (residuos 65-152 que corresponden al dominio PDZ de sintrofina de pez torpeda), ZO1 (residuos 408-491 que corresponden al segundo dominio PDZ de ZO1), ZO2 (residuos 93-176 que corresponden al dominio PDZ de ZO2), Lin 2a (residuos 542-628), y p55 (residuos 67-153). [Adaptada de Doyle y cols., 1996]

penúltimo residuo -1 o 1 (p.-1 o p.1, dependiendo de los trabajos) y así sucesivamente. El péptido ETSV-COOH se acomoda en el bolsillo hidrofóbico que se genera entre la hélice- $\alpha$  B y el lazo  $\beta$ A- $\beta$ B del dominio PDZ, de tal forma que la Thr en p.2 (ligando) forma un puente de hidrógeno con la His de  $\alpha$ B (PDZ) y la Val en p.0 (ligando) interacciona mediante puentes de hidrógeno con el lazo  $\beta$ A- $\beta$ B (secuencia GLGF del dominio PDZ). Los residuos del ligando en p.1 y p.3 también juegan un papel importante en la unión PDZ-ligando al interactuar con la hebra  $\beta$ B mediante puentes de hidrógeno (Figura II.36).

Este reconocimiento del ligando en posición C-terminal por proteínas con dominios PDZ de clase I (Figura II.36) lo llevan a cabo proteínas como SAP97, PSD-95,  $\alpha$ 1-sintrofina o GRASP55 con canales iónicos o receptores de membrana (Doyle y cols., 1996; Leonoudakis y cols., 2001, 2004a y 2004b; Gee y cols., 2011).

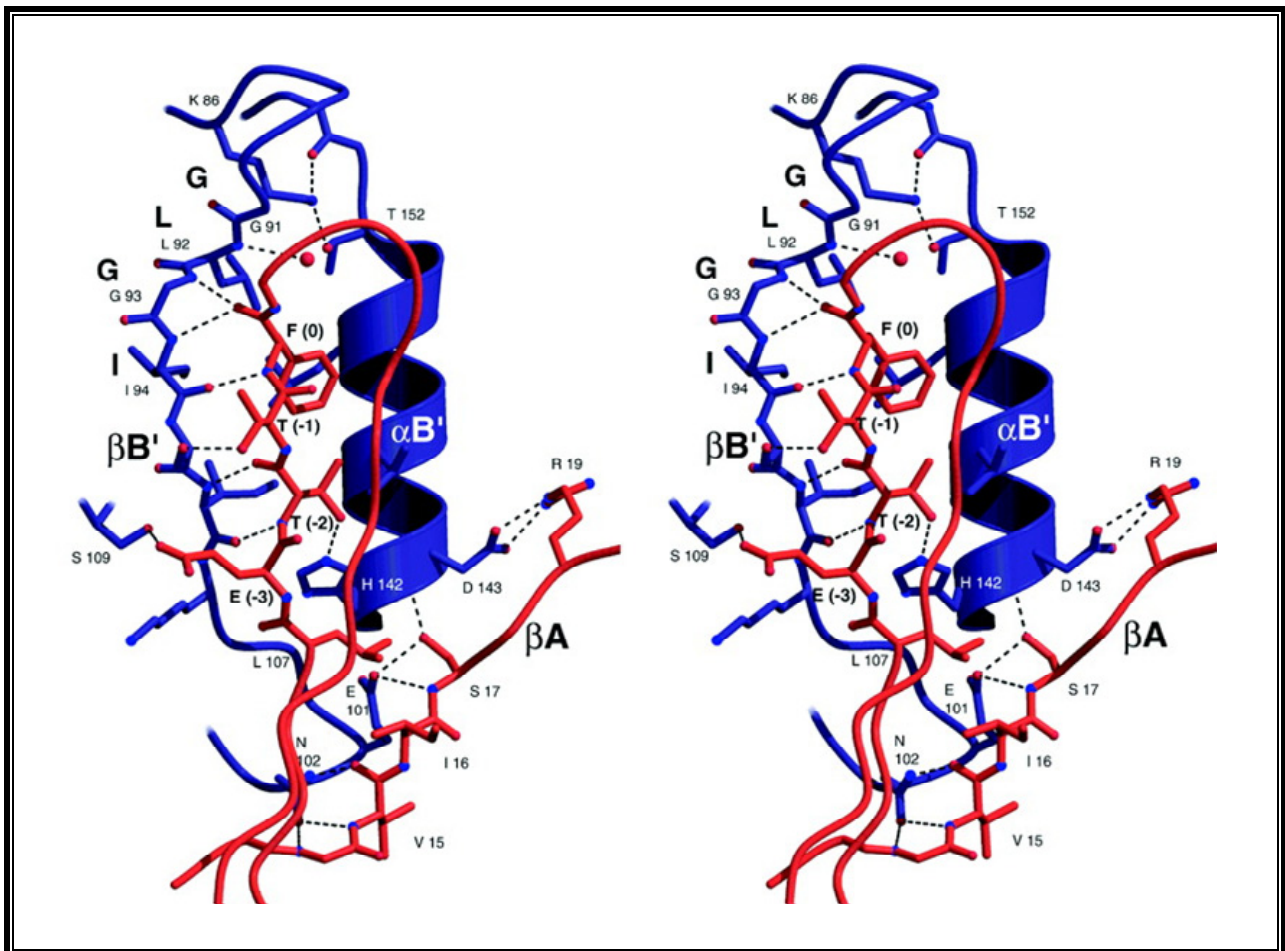


**Figura II.36. Interacciones químicas involucradas en la interacción entre el péptido ETSV y el PDZ3 de PSD-95.** Estéreo visión del sitio de unión del ligando en el dominio PDZ3 de PSD-95 mediante puentes de hidrógeno (guiones blancos) y la localización de la Valina en posición 0 del péptido (ETSV) dentro del bolsillo hidrofóbico formado por el lazo GLGF y  $\alpha$ B. Los átomos de oxígeno se muestran en rojo y en azul los átomos de nitrógeno. La esfera verde muestra una molécula de agua unida al grupo carboxilo de la Arg318. [Adaptada de Doyle y cols., 1996].

- Reconocimiento y unión a secuencia interna

Algunos dominios PDZ también interactúan con secuencias localizadas en regiones internas de diferentes proteínas (Hillier y cols., 1999; Hurd y cols., 2003; London y cols., 2004). De hecho, mediante experimentos de sistema de doble híbrido en levaduras se demostró que más de la mitad de las interacciones PDZ-ligando no necesitan el extremo C-terminal del ligando libre, lo cual sugiere que la unión a secuencias internas puede ser más común de lo que se esperaba en un principio (Lenfant y cols., 2010). Para que la unión entre una secuencia interna y un dominio PDZ se lleve a cabo, es necesario superar el impedimento estérico entre los aminoácidos situados más allá de la posición 0 (p.0) del ligando y el lazo GLGF del dominio PDZ.

Por ejemplo, la estructura del complejo formado por el dominio PDZ de la  $\alpha 1$ -sintrofina y 30



**Figura II.37.** Estructura en  $\beta$ -lámina (rojo) perteneciente a nNOS que mimetiza el ligando C-terminal al que se une el dominio PDZ de  $\alpha 1$ -sintrofina (azul). Imagen en estereovisión del pseudopéptido (rojo) que forma una parte de la secuencia de la nNOS para unirse al bolsillo hidrofóbico del dominio PDZ de la  $\alpha 1$ -sintrofina (azul). Los residuos del pseudopéptido de la nNOS (ETTF) están indicados entre paréntesis. Todos los demás números están referidos al residuo de cada proteína. La secuencia GLGF está señalada en negrita. Los puentes de hidrógeno se muestran en línea discontinua, y una molécula de agua es mostrada como una esfera roja. [Adaptada de Hillier y cols., 1999].

aminoácidos de la nNOS (que aunque son cercanos, no pertenecen al dominio PDZ de ésta proteína), reveló que el impedimento estérico puede ser evitado cuando el ligando adopta una conformación de lámina- $\beta$  para sustituir al carboxilo terminal (Figura II.37). Como se puede apreciar en esta imagen, el pseudopéptido formado por una estructura en lámina- $\beta$  perteneciente a la nNOS [E(p.3)-T(p.2)-T(p.1)-F(p.0)] simula el extremo C-terminal de un ligando canónico en la interacción con el dominio PDZ de la  $\alpha$ 1-sintrofina (Hillier y cols., 1999). Sin embargo, el grupo carboxilo terminal del ligando canónico es sustituido por una horquilla  $\beta$  al final del pseudopéptido. Además, se ha demostrado que el dominio PDZ de la  $\alpha$ 1-sintrofina puede reconocer y unirse a péptidos cíclicos que pueden adquirir una conformación similar al pseudopéptido de la nNOS (Gee y cols., 1998b).

Otros ejemplos de reconocimiento de secuencias internas son: a) el dominio PDZ de Par6 (*Partitioning defective protein 6*) que se une a una región interna de la proteína PALS1 (*protein-associated with Lin7, Stardust, MPP5*) (Peterson y cols., 2004), b) el dominio PDZ2 de DVL2 (*Dishevelled Segment Polarity Protein 2*) que reconoce diferentes péptidos internos que sustituyen el carboxilo terminal por un ácido aspártico (Zhang y cols., 2009) o c) la proteína PSD-95 que interacciona tanto con una región interna situada en el extremo N-terminal de los canales Kv1.5 como con el extremo C-terminal canónico (Elstrom y cols., 2003).

- Interacciones PDZ-PDZ

Se ha demostrado que algunos dominios PDZ pueden interactuar con otros dominios PDZ. Por ejemplo los PDZ3 y PDZ4 de la proteína INAD (*Inactivation no afterpotential D protein*) pueden formar homo- o hetero-oligómeros, y los dominios PDZ de NHERF1 y NHERF2 (*Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger Regulatory Factors*) pueden hetero u homodimerizar sin afectar a la unión del ligando (péptido) (Xu y cols., 1998; Lau y cols., 2001). Un estudio reciente llevado a cabo por Chang y cols., reveló que al menos el 30% de los dominios PDZ pueden llevar a cabo interacciones PDZ-PDZ (Chang y cols., 2011). Las interacciones PDZ-PDZ parecen más selectivas que las interacciones PDZ-péptido y por lo tanto contribuyen a definir de forma precisa la composición de los complejos proteicos. La prevalencia de una alta afinidad específica en las interacciones PDZ-PDZ sugiere que estos dominios pueden formar complejos multiproteicos debido a la interacción simultánea con más de un ligando a la vez (Chang y cols., 2011) puesto que estas interacciones normalmente dejan disponibles los sitios de unión a ligando (péptido).

- Interacciones PDZ-fosfolípidos

Como se ha visto en apartados anteriores, los dominios PDZ de una u otra forma son módulos de interacción proteína-proteína, por este motivo fue sorprendente el descubrimiento hace 15 años de que además estos dominios pueden unir fosfoinosítidos (PIPs) (Zimmermann y cols., 2002). Los PIPs son formas fosforiladas del fosfatidil inositol y son unos importantes reguladores de la polaridad celular y la señalización. Éstos pueden servir como precursores de segundos mensajeros, funcionar como moléculas señalizadoras que regulan la localización, transporte y degradación de proteínas (Schink y cols., 2016) o regular la funcionalidad de diversos canales iónicos (Hansen y cols., 2011 y 2015). Se ha estimado que entre un 20 y un 40 % de los dominios PDZ interactúan con fosfolípidos (Gallardo y cols., 2010; Chen y cols., 2012) y en los casos investigados, las interacciones PDZ-PIPs parecen relevantes para la función de las proteínas PDZ. Las interacciones PDZ-PIPs a menudo ocurren en tándem con ayuda de otros módulos pertenecientes a la misma proteína que unen igualmente lípidos. Tal es el caso del dominio PDZ de la  $\alpha$ 1-sintrofina que divide al dominio PH (*Pleckstrin homology*) en dos, situándose en el centro y actuando este tándem PDZ-PH como un supramódulo que puede unir con mayor afinidad diferentes tipos de fosfolípidos (Yan y cols., 2005).

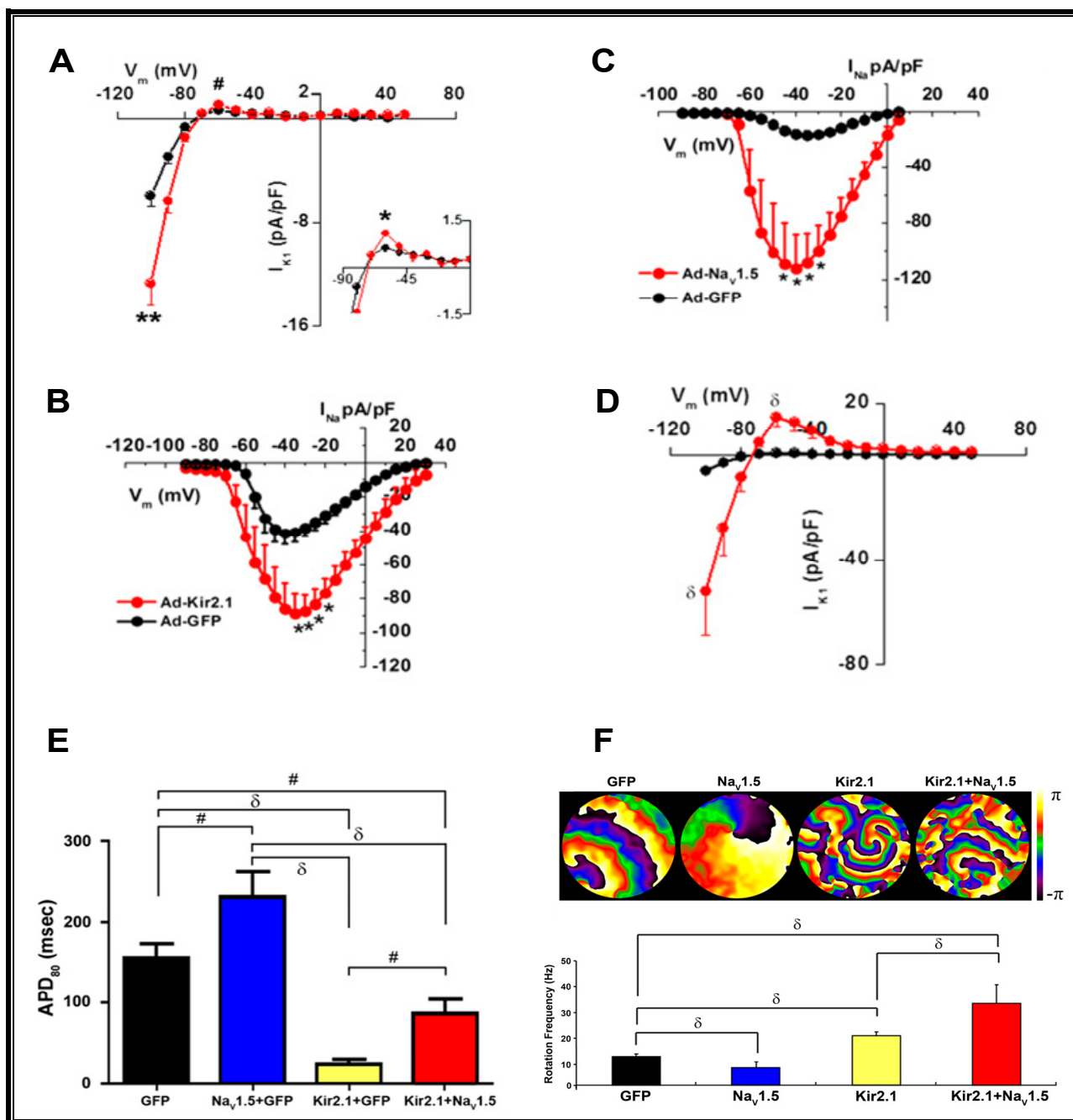
### 5.7. Canalosomas formados por canales Kir2.1-Nav1.5

Como ya se ha mencionado anteriormente, el impulso cardiaco depende de una orquestada interacción de canales iónicos TM. Controlando el potencial de reposo de membrana, la  $I_{K1}$  modifica la disponibilidad de los canales de sodio y por tanto, modifica la excitabilidad celular, la duración del potencial de acción, y la velocidad de propagación del impulso (Noujaim y cols., 2007b). Por su parte, de la disponibilidad de los canales de  $\text{Na}^+$  dependerá la excitabilidad y la refractariedad cardiacas. Asimismo, las interacciones  $I_{K1} - I_{\text{Na}}$  son claves a la hora de determinar la frecuencia de los rotors, que son responsables de la reentrada eléctrica anómala y a veces letal (Noujaim y cols., 2007b) (ver apartado 6).

#### 5.7.1. Modulación recíproca positiva Kir2.1-Nav1.5

Mediante técnicas moleculares, bioquímicas y electrofisiológicas se ha demostrado que existe una modulación recíproca positiva entre la densidad de la  $I_{K1}$  y de la  $I_{\text{Na}}$  que es consecuencia de una

modulación recíproca positiva de la expresión de los respectivos canales (Kir2.1 y Nav1.5) (Milstein y cols., 2012). La consecuencia es la perfecta coordinación de los canales que determinan la excitabilidad cardíaca. Milstein y cols. confirmaron mediante la sobreexpresión por infección con adenovirus en miocitos ventriculares de ratas adultas que codificaban para el canal Nav1.5 que se



**Figura II.38. Modulación recíproca de Kir2.1 y Nav1.5 en miocitos ventriculares de rata adulta.** La sobreexpresión de Nav1.5 mediante infección por adenovirus (Ad) incrementa tanto densidad de la  $I_{K1}$  (A) como de la  $I_{Na}$ . La sobreexpresión de Kir2.1 mediante infección por adenovirus incrementa tanto densidad de la  $I_{Na}$  (B) como de la  $I_{K1}$  (D). La co-sobreexpresión de Nav1.5 y Kir2.1 reduce significativamente la DPA en miocitos ventriculares de ratas neonatales (E). Las interacciones moleculares entre Kir2.1-Nav1.5 modulan la frecuencia de reentrada en monocapas de miocitos ventriculares de ratas neonatales (F); *Arriba*, mapas de fase de monocapas infectadas con Ad-GFP, Ad-Nav1.5, Ad-Kir2.1 o Ad-Kir2.1 + Ad-Nav1.5; *Abajo*, frecuencias de reentrada en monocapas infectadas de la misma manera. \* $P < 0.005$ ; # $P < 0.05$ ;  $\delta P < 0.01$ . [Adaptadas de Milstein y cols., 2012]

incrementaba tanto la densidad de la  $I_{Na}$  como de la  $I_{K1}$  (Figura II.38A y C). Por otro lado, la sobreexpresión de canales Kir2.1 en miocitos de ratas adultas mediante adenovirus también producía incremento en la densidad de la  $I_{Na}$  y de la  $I_{K1}$  (Figura II.38B y D). Asimismo, la co-sobreexpresión de Nav1.5 y Kir2.1 reducía significativamente la DPA en miocitos ventriculares de ratas neonatales (Figura II.38E). Por último, Milstein y cols demostraron que las interacciones moleculares entre Kir2.1-Nav1.5 modulan la frecuencia de reentrada en monocapas de miocitos ventriculares de ratas neonatales (Figura II.38F), produciéndose una elevación de la frecuencia cuando los dos canales eran sobreexpresados que cuando sólo se sobreexpresaba Kir2.1 (Milstein y cols., 2012). Se propuso en este mismo trabajo que la proteína SAP97 era un componente fundamental para la modulación recíproca de este macrocomplejo molecular formado por al menos estos dos canales, puesto que dicha proteína posee tres dominios PDZ a los que podrían unirse a la vez al menos un canal de sodio y un canal de potasio (Milstein y cols., 2012).

### 5.7.2. Proteínas implicadas en el tráfico y localización de los canales Kir2.1-Nav1.5

Como se ilustra en la Figura II.39, en el corazón, Nav1.5 y Kir2.1 interaccionan independientemente con al menos dos proteínas con dominios PDZ, SAP97 y  $\alpha$ -1-sintrofina (Leonoudakis y cols., 2001; Gavillet y cols., 2006; Vikstrom y cols., 2009). También se ha constatado que estos canales interaccionan con proteínas como placofilina 2 (Sato y cols., 2009 y 2011), anquirina G (Mohler y cols., 2004; Cunha y Moler, 2006), distrofina (Petitprez y cols., 2011) y caveolina 3 (Vaidyanathan y cols., 2013) entre otras, y que mutaciones hereditarias en éstas modifican la expresión funcional y la localización de Kir2.1 y Nav1.5 en los cardiomiocitos (Figura II.39). Hasta el momento, no se ha determinado ni en qué compartimento celular se produce la unión de estos dos canales, ni si son necesarias proteínas accesorias y cuáles son las que determinan la modulación recíproca positiva. En el momento actual se desconoce cuál es el mecanismo por el cual la presencia conjunta de canales Kir2.1 y Nav1.5 aumenta recíprocamente la densidad de la  $I_{Na}$  e  $I_{K1}$ . Es posible que aumente la estabilidad de los canales en membrana porque disminuya la degradación de los canales que están formando un complejo en el mismo canalosoma. Otra posibilidad es que aumente la glicosilación en el trans-Golgi aumentando la presencia de canales maduros funcionales o el tráfico de los canales desde el RE al Golgi y desde ahí a la membrana. Por último cabe también que se favorezcan la aparición de rutas de tráfico alternativas que incrementen la expresión en la membrana de estos dos canales (Figura II.38).

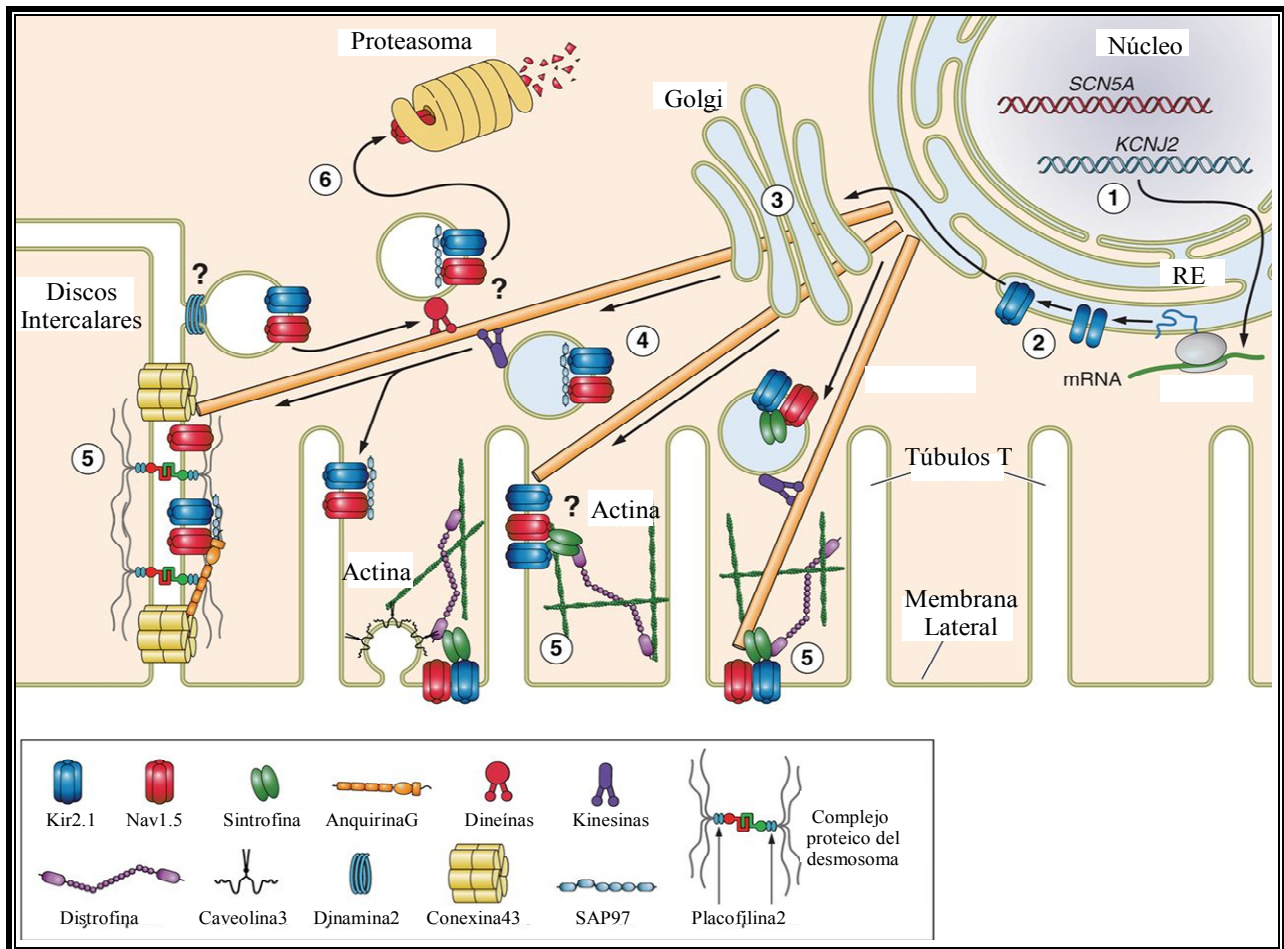


Figura II.39. Posibles pasos y proteínas asociadas al tráfico intracelular y localización de Nav1.5 y Kir2.1 en un cardiomiocito. (1) Transcripción; (2) Traducción; (3) Glicosilación en el Golgi; (4) Tráfico vesicular; (5) Localización compartimental y función; (6) Tráfico retrógrado vesicular, degradación proteica y reciclaje. [Adaptada de Willis y cols., 2015]

### 5.7.3. Consecuencias clínicas

Los resultados obtenidos hasta la fecha proporcionan la evidencia experimental directa de que los canales Kir2.1 y Nav1.5 comparten en común proteínas accesorias que son importantes en el tráfico y en la localización en membrana de ambos canales. Las implicaciones patofisiológicas del equilibrio (o desequilibrio) entre la  $I_{K1}$  y la  $I_{Na}$  son de particular relevancia en el contexto de los síndromes arritmogénicos adquiridos o hereditarios en los que la densidad funcional de Kir2.1 y Nav1.5 a nivel del sarcolema está modificada. Tal es el caso del SBr y del SAT, pues ambos síndromes hereditarios han sido asociados con mutaciones que disminuyen el tráfico de Nav1.5 y Kir2.1, respectivamente a la membrana.

Además, sería clínicamente relevante saber si la modulación recíproca positiva ocurre entre canales Kir2.3 y Nav1.5 dada la expresión diferencial de los canales Kir2.x en las aurículas, donde

la expresión de Kir2.3 es mayoritaria, frente a la de los ventrículos, donde la  $I_{K1}$  es generada principalmente por los canales Kir2.1.

Dado que los canales Kir2.1 y Nav1.5 presentan modulación recíproca positiva, es razonable suponer que las mutaciones que disminuyen el tráfico de canales Kir2.1 reducirán la expresión de los canales Nav1.5 y esto debería contribuir a exacerbar el fenotipo arritmogénico al disminuir la excitabilidad celular. A la inversa, es razonable especular que la disminución de la expresión de canales Nav1.5 estará ligada a la reducción de la expresión de Kir2.1 y por lo tanto de  $I_{K1}$ . Este hecho llevaría a la despolarización de la membrana celular, disminución de la  $I_{Na}$  a través de la deactivación parcial de Nav1.5, y disminuiría aún más la velocidad de conducción e incrementaría la frecuencia de la arritmia.

## 6. ARRITMIAS POR REENTRADA DEL IMPULSO CARDIACO

### 6.1. Conceptos básicos

Clásicamente se distinguen dos mecanismos por los que se generan las taquiarritmias cardiacas: alteraciones en la secuencia de activación del miocardio (*reentrada*) y alteraciones en la iniciación del impulso (*origen focal*). La actividad arrítmica cardiaca puede ser organizada o bien puede ser aparentemente caótica. En este caso se habla de arritmias fibrilatorias. La *fibrilación ventricular* puede desencadenar en pocos segundos la muerte del paciente y es la principal causa de muerte súbita cardiaca. Por el contrario la *fibrilación auricular* (FA) es la arritmia de mayor prevalencia en la población general (más de 1 millón de españoles la padece) y aunque no es una urgencia vital (puede ser crónica) aumenta significativamente la mortalidad de los pacientes. El origen focal consiste en la aparición de un foco ectópico que genera actividad eléctrica automática. En otras ocasiones se deben a alteraciones en la actividad del marcapasos fisiológico (el nodo sinusal) que, o bien aumenta marcadamente su frecuencia de disparo (taquicardia sinusal), o bien la disminuye (bradicardia sinusal). Con mucho, el mecanismo que mayoritariamente da origen a las arritmias cardiacas es la reentrada. En condiciones normales un impulso generado en el nodo sinusal muere tras la activación secuencial de aurículas y ventrículos, puesto que va quedando rodeado de tejido que acaba de excitar y que se encuentra, por tanto, en periodo refractario. Sin embargo, en condiciones especiales, el impulso puede persistir y reexcitar dos o más veces el miocardio (*reentrada*). La reentrada consiste, por tanto, en la perpetuación de un impulso en forma de frente de activación que gira constantemente definiendo con su trayectoria un circuito cerrado (*circuito de*

*reentrada*) y activando el miocardio adyacente en cada giro. Para que se inicie esta recirculación es necesario que el impulso se bloquee en una dirección (*bloqueo unidireccional*), obligando al frente a invadir el circuito en el sentido contrario. El bloqueo se puede producir por la existencia de discontinuidades entre células (desacoplamiento celular o fibrosis), por discontinuidades macroscópicas del miocardio (debido a que éste se organiza en haces de fibras que convergen o divergen en distintos puntos), o por la presencia de obstáculos inexcitables que pueden ser anatómicos (las inserciones de las venas cavas o una escara quirúrgica o de un infarto previo) o funcionales (tejido excitable que en un momento dado no lo es) (Delpón y Tamargo, 2005).

G. Mines y T. Lewis en 1914 y 1915, respectivamente, estudiando la activación eléctrica realizando los experimentos en anillos de medusa y en preparaciones cardíacas de tortuga propusieron que para que se produjera la reentrada, el frente de activación debía girar en torno a un tejido inexcitable que actuaba como obstáculo anatómico (*reentrada anatómicamente determinada*. P. ej. el flutter auricular) (Mines, 1914; Lewis, 1915). Posteriormente, Rosenblueth y Wiener demostraron la existencia de circuitos en los que no estaba presente de dicho obstáculo (*reentrada funcionalmente determinada*) (Rosenblueth y Wiener; 1946). En este caso el impulso gira en torno a un área del miocardio que puede ser muy pequeña (< 1 cm) que en ese momento no es excitable. Las células parcialmente despolarizadas (p.ej. por la isquemia o la fibrosis) o estimuladas prematuramente antes de que completen la repolarización, en particular cuando hay diferencias en la DPA entre áreas adyacentes, pueden crear áreas inexcitables. En estos circuitos no hay apenas intervalo entre el frente de activación y la estela de periodo refractario del giro anterior (circuitos sin hiato excitable), de modo que se excita tejido sólo parcialmente repolarizado, por lo que la velocidad de conducción (VC) es muy lenta.

Ambos mecanismos no son excluyentes entre sí y, de hecho, lo más probable es que puedan coexistir (Nattel, 2002; Fuster y cols., 2006; Kourliouros y cols., 2009).

## **6.2. Evolución de las teorías de reentrada**

Dado que la arritmia de mayor prevalencia en la población general es la FA durante los últimos 60 años se ha dedicado un ingente esfuerzo experimental para desentrañar el mecanismo por el cual ésta se genera y se perpetúa. Desde los estudios de llevados a cabo por el Dr. G. Moe, la teoría más aceptada es que la FA se genera por la reentrada del uno o varios impulsos en el miocardio auricular. Por tanto, sírvanos la cronología de las distintas teorías sobre la génesis de la FA para ilustrar la evolución de las teorías de la reentrada del impulso eléctrico.

El Dr. Moe propuso que la FA implicaba la activación caótica, continua y desordenada de la aurícula por múltiples frentes de onda (*multiple wavelets theory*) de longitud y dirección variables (Moe., 1959). Según esta hipótesis, todo el miocardio auricular participaría en el mantenimiento de frentes de activación simultáneos que continuamente giran, se dividen, se fusionan o chocan entre sí extinguiéndose. Los frentes de onda se fraccionarían en “ondas hijas” que se autoperpetuarían, propagándose por las aurículas (Moe y cols., 1964). El soporte experimental de esta hipótesis fue aportado por Allesie y cols., (Allesie y cols., 1985) que cartografiaron cómo la excitación se extendía por la aurícula de perros durante la generación de una FA rápida en presencia de ACh, demostrando la existencia de múltiples ondas de propagación que provocaban una actividad auricular turbulenta. Propuso además la hipótesis de *leading circle* en donde las ondas girarían alrededor de un obstáculo funcional y el frente de onda se establecería de tal forma que recorriese el mínimo trayecto para mantener la reentrada (Allesie y cols., 1985; Comtois y cols., 2005; Jalife, 2011; Pandit y Jalife, 2013). Un concepto importante para comprender la teoría de Allesie es el de *longitud de onda* (propuesta originalmente por Wiener y Rosenblueth), que se define como la distancia que recorre el impulso eléctrico durante un periodo refractario, siendo el producto del periodo refractario por la VC. Para que la activación auricular persista (y que el frente de onda reexcite el miocardio) es necesario que el tiempo que el impulso tarda en recorrer el circuito sea superior al tiempo que el tejido tarda en recuperar su excitabilidad (es decir, superior al periodo refractario auricular). La coexistencia de periodos refractarios auriculares cortos y no uniformes y de una VC intra-auricular lenta, aumenta el número de circuitos de reentrada y facilita el automantenimiento de la fibrilación.

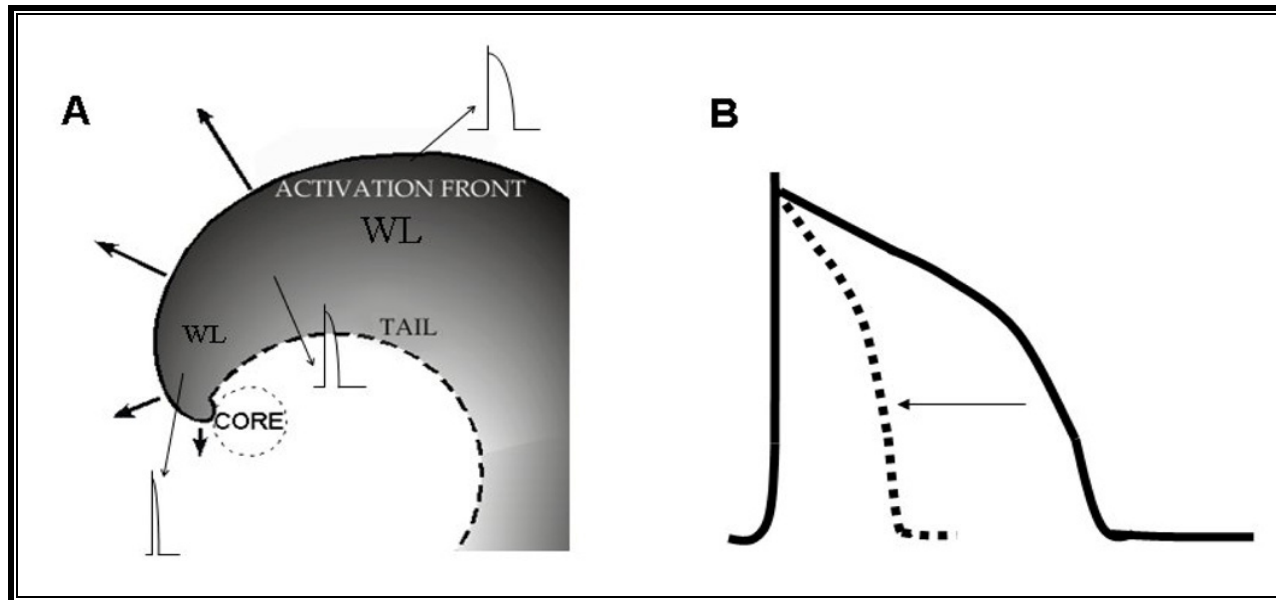
El concepto teórico de los rotores, producidos por ondas espirales, se desarrolló posteriormente por Krinsky y cols. en la URSS y por Winfree en Reino Unido (Krinsky, 1966; Winfree, 1987), concepto que se demostró en 1990 en músculo ventricular de ovejas por Davidenko y cols. (Davidenko y cols., 1990).

Se denomina *rotor* a la reentrada generada por frentes curvos que gira en torno a un eje vertical imaginario denominado *pivote* a gran velocidad. Los rotores generan frentes de excitación a frecuencias muy altas (>10 Hz) que invaden el resto del corazón de forma desorganizada y que presentan conducción fibrilatoria. Los rotores parecen tener un papel fundamental en la fibrilación tanto auricular como ventricular.

La teoría de los rotores nace de la observación de reacciones químicas en medios excitables como la reacción de Belousov–Zhabotinsky, claro ejemplo de la termodinámica del no equilibrio (Belousov, 1958; Zhabotinsky, 1964), y está muy influenciada por hallazgos obtenidos en experimentos de imagen de flujos de  $[Ca^{2+}]_i$  en oocitos de *Xenopus* y por el resultado de

simulaciones en modelos matemáticos (Schotten y cols., 2011). El músculo cardiaco es un medio excitable y como tal, comparte muchas de las características observadas en este tipo de medios, en cuanto a la propagación de ondas espirales. Al mismo tiempo que Allesie desarrollaba su concepto del *leading circle*, se desarrollaron experimentos químicos y modelos matemáticos que predecían que el corazón podría tener actividad eléctrica que rotase alrededor de un obstáculo funcional (Jalife, 2011). Aunque no universalmente aceptada, la teoría de los rotores se ha convertido en una importante explicación mecanística de la fibrilación (Skanes, 2009; Voigt y cols., 2010; Narayan y cols., 2012).

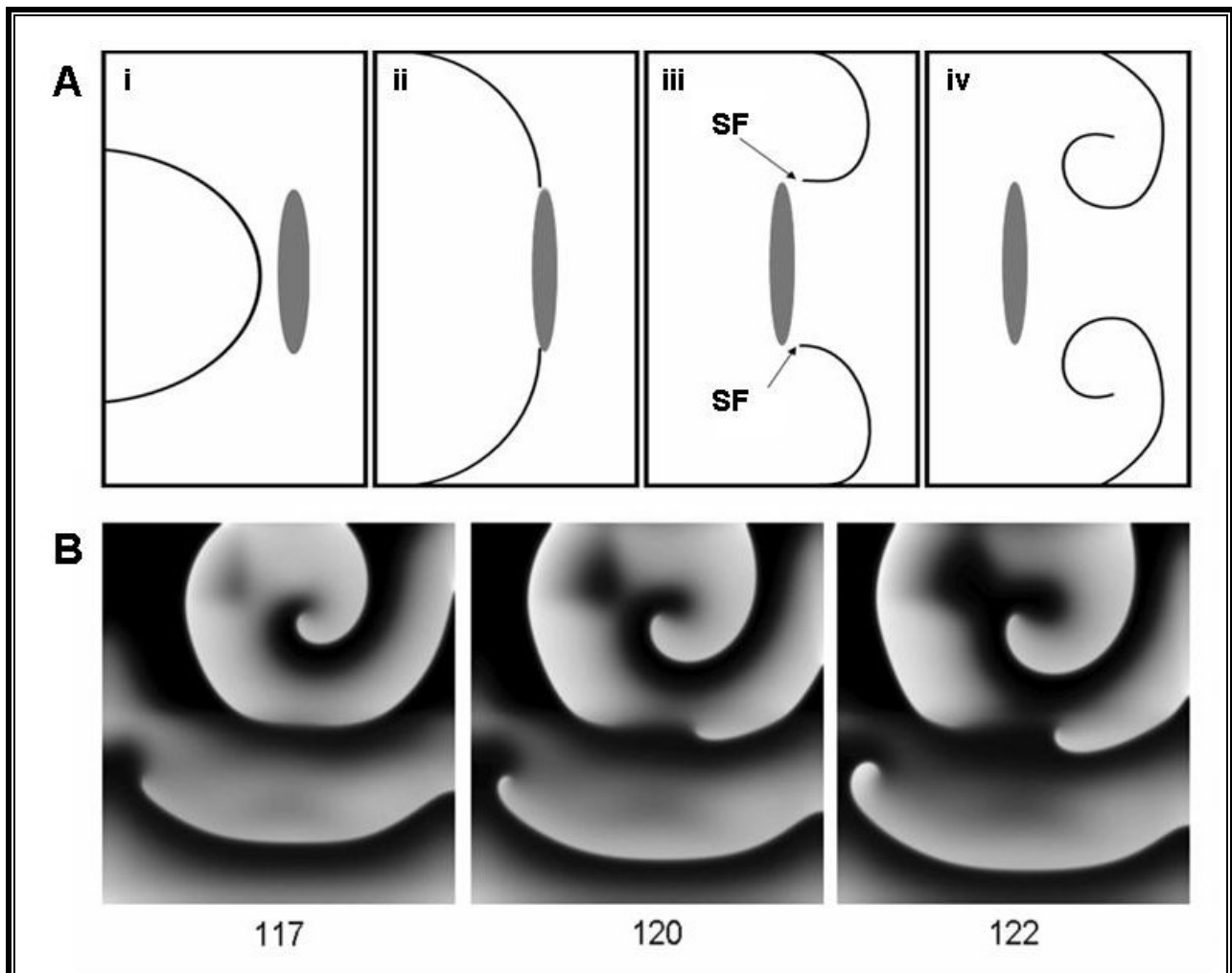
La VC de un frente de excitación en el miocardio (*source/sink ratio*) depende de la relación entre la intensidad de la corriente despolarizante proporcionada por las células excitadas (*source*) y la corriente necesaria para la excitación de las células en reposo que el frente encuentra en su avance (*sink*). Haciendo una aproximación simplificada, en el caso de un frente lineal, cada célula excitada es responsable de la despolarización de “una única célula” por lo que este balance es equilibrado y la VC del frente es única y estable. Por el contrario, en el caso de un frente espiral, la curvatura del frente implica que el número de células en reposo que debe ser despolarizado por cada



**Figura II.40. Efectos electrofisiológicos del centro de rotación (*core*) en la VC, duración del potencial de acción (DPA) y longitud de onda (WL).** (A) Durante la reentrada, el frente de onda adopta una forma de espiral con un incremento de la curvatura hacia el centro de rotación (*core*); su VC disminuye gradualmente hacia el centro (flechas gruesas), alcanzando un valor crítico en las inmediaciones del *core*. Como resultado se establece un desajuste entre la corriente despolarizante (principalmente  $I_{Na}$ ) suministrada por el frente de onda y la corriente electrofisiológica que es controlada principalmente por  $I_{K1}$  y necesaria para despolarizar las células en reposo dentro del centro de rotación, que permanece sin excitar. Como consecuencia, se genera un gradiente de voltaje entre el centro de rotación sin excitar y la periferia de las células excitadas, lo cual acorta la DPA (B), por lo tanto, la longitud de onda, VC y DPA cerca del *core* es mucho más pequeña que lejos del centro de rotación. [Adaptada de Vaquero y cols., 2008]

célula excitada aumenta, de modo que la carga de la célula excitada debe repartirse entre varias células para que el frente pueda avanzar. Esto implica que la VC disminuye y lo hará tanto más cuanto mayor sea la curvatura del frente. Por tanto, la VC de un frente espiral no es única, sino que disminuye progresivamente a medida que la curvatura del frente aumenta y nos acercamos al pivote del rotor. De hecho, el pivote del rotor se mantiene en reposo a pesar de que el tejido sea excitable (Fast y Kleber, 1997; Comtois y cols., 2005; Schotten y cols., 2011). Además, el pivote del rotor tiene un poderoso efecto electrotónico, por lo que tiende a provocar un acortamiento de la DPA a sus alrededores, lo que, junto con la baja VC, explica la corta longitud de onda en sus proximidades (Figura II.40) (Vaquero y cols., 2008; Schotten y cols., 2011; Jalife 2011).

En consecuencia, un frente de onda espiral no se puede definir por una única longitud de onda,



**Figura II.41. Formación y fragmentación de rotores.** (A) Formación de un rotor. Una onda alcanza un obstáculo funcional (i) y empieza a circunvalarlo (ii). Si las condiciones de excitabilidad son las adecuadas, dos ondas hijas se separan del obstáculo, generando una singularidad de fase (SF) en cada extremo roto (iii). Las ondas formadas se curvan alrededor de las singularidades y empiezan a rotar (iv). (B) Modelo por ordenador de un rotor a altas frecuencias en una monocapa de miocitos ventriculares. Se aprecia como las ondas que emanan del rotor se fragmentan, iniciando una conducción fibrilatoria. Los números bajo cada fotograma indican milisegundos. [Adaptada de Vaquero y cols., 2008]

puesto que la VC y el período refractario no son iguales a lo largo de todo el frente, sino que aumentan continuamente desde el eje hasta la periferia (Beaumont y cols., 1998; Jalife, 2011).

Los frentes de onda espirales procedentes de la formación del rotor se propagan a través del músculo cardíaco y chocan con obstáculos anatómicos o funcionales produciendo a su vez la fragmentación y formación de nuevos frentes de onda (Figura II.41) (Jalife y cols., 2002; Jalife y cols., 2004, Vaquero y cols., 2008). Éstas pueden acabar formando un nuevo rotor resultando en una constante fragmentación de ondas dependiente de la frecuencia (Berenfeld y cols., 2002; Jalife y cols., 2005).

Un rotor necesita espacio suficiente para girar (*elbow room*); cuando dos rotores chocan, el de mayor frecuencia absorberá al de menor frecuencia. Una vez iniciados, los rotores girarán a alta velocidad generando una turbulencia eléctrica conocida como conducción fibrilatoria. La distribución heterogénea de los canales iónicos en el miocardio hace que los rotores residan en áreas específicas cuya estructura, propiedades eléctricas y un período refractario corto promueva el acoplamiento del rotor (Jalife y cols., 1998).

### 6.3. Los rotores en la génesis de la FA

Recientemente se ha publicado el primer estudio de mapeo espacio-temporal de la dinámica de la FA en 49 pacientes que iban a ser sometidos a ablación (Narayan y cols., 2012). Cuarenta y siete de los 49 pacientes presentaban rotores estables, y 11 de los 49 mostraban además focos automáticos que provocaban conducción fibrilatoria a su alrededor. Las tres cuartas partes de las fuentes fibrilatorias se localizaban en la AI donde se encontraban las frecuencias dominantes. Este resultado concuerda con los datos experimentales obtenidos mediante análisis espectral de alta resolución, que muestran que la pared posterior de la AI es la que alberga las fuentes con actividad espacio-temporalmente organizada más rápida. (Mandapati y cols., 2000; Kalifa y cols., 2006). Los frentes de onda generados por estas fuentes adquieren patrones de conducción espacialmente complejos a medida que se acercan a la AD, y en conjunto, se manifiestan como un patrón de conducción fibrilatoria (Berenfeld y cols., 2002). Por tanto, el avance tecnológico ha permitido demostrar que en algunos tipos de fibrilación existe un patrón organizado en la actividad eléctrica que es cámara-dependiente y que no concuerda con la activación caótica propuesta por la teoría de los múltiples frentes de onda (Jalife, 2003). Diversos estudios en modelos animales de fibrilación sugieren que la AI es la aurícula principalmente implicada en el mantenimiento de la misma. Dos estudios en un modelo ovino de FA crónica y en un modelo canino de FA paroxística (Morillo y cols., 1995; Skanes y cols., 1998; Mansour y cols., 2001) demostraron que las frecuencias más

rápidas ocurrían en la pared posterior de la AI y que existía un gradiente de frecuencia AI-AD. De hecho, la frecuencia dominante aumenta en el paso de la FA paroxística a persistente (Berenfeld y Jalife, 2014).

Un estudio en pacientes que iban a ser sometidos a ablación quirúrgica de las VP llevado a cabo por el grupo de Lazar y cols. (Lazar y cols., 2004) obtuvo las siguientes conclusiones: 1) que existe un gradiente de frecuencias AI-AD, en consonancia con los resultados en modelos experimentales y 2) que este gradiente desaparecía cuando la FA se mantenía durante más de un mes, lo que se atribuía a un aumento de la frecuencia de la AD hasta hacerse similar a la de la AI.

La razón por la cual la AI alberga las fuentes con mayores frecuencias todavía no se comprende del todo. Probablemente la causa sea multifactorial, por lo que es necesario el estudio de las propiedades específicas de la AI. Estas propiedades pueden resumirse en: a) la AI está expuesta a una mayor presión intracavitaria y por lo tanto sus paredes y músculos son más gruesos y heterogéneos que los de la AD; b) Las VP están localizadas en la AI; c) los bordes del fascículo septopulmonar de la pared posterior de la AI forman una barrera tridimensional efectiva que dificulta la propagación de los impulsos eléctricos prematuros generados en las VP (Hocini y cols., 2010). A medida que se desplazan por la aurícula, algunas de estas ondas pueden romperse, iniciando el proceso de reentrada; d) la rica inervación de la pared posterior de la AI, ya que en muchos pacientes, los paroxismos de fibrilación son iniciados por descargas simpáticas o vagales (Sarmast y cols., 2003; Shen y cols., 2012); e) los procesos de dilatación y estiramiento establecen las condiciones para la formación de los rotores primarios en la pared posterior de la AI (Kalifa y cols., 2003; Yamazaki y cols., 2009); f) la edad, la disfunción diastólica, el remodelado eléctrico y la fibrosis establecen el sustrato ideal para la fibrilación (Swartz y cols., 2009; Lubitz y cols., 2010; Savelieva y cols., 2010); g) los PAs de la AI son más breves que los de la AD y, además, el remodelado eléctrico asociado a la FA acorta más la DPA de los PAs de la AI que la de los de la AD (González de la Fuente y cols., 2013). Todos estos procesos tienden a ser más marcados en la AI que en la AD (Swartz y cols., 2009).

Sin embargo, no existían apenas datos en cuanto a las posibles diferencias en las propiedades electrofisiológicas entre los miocitos de ambas aurículas que pudieran explicar por qué las fuentes de origen de la FA y la mayor frecuencia de la actividad aparecen en la AI. Hasta la fecha, la mayor parte de los datos en lo que respecta a las diferencias en las características eléctricas entre ambas aurículas proviene de estudios con animales de experimentación. Un estudio en un modelo de ratón (Nygren y cols., 2004) determinó que la DPA era más corta en los miocitos de la AI que en los de la AD. Otro estudio en perros (Li y cols., 2001) demostró una mayor densidad de  $I_{Kr}$  en los miocitos de la AI que en los de la AD y no encontró diferencias significativas en ninguna de las demás

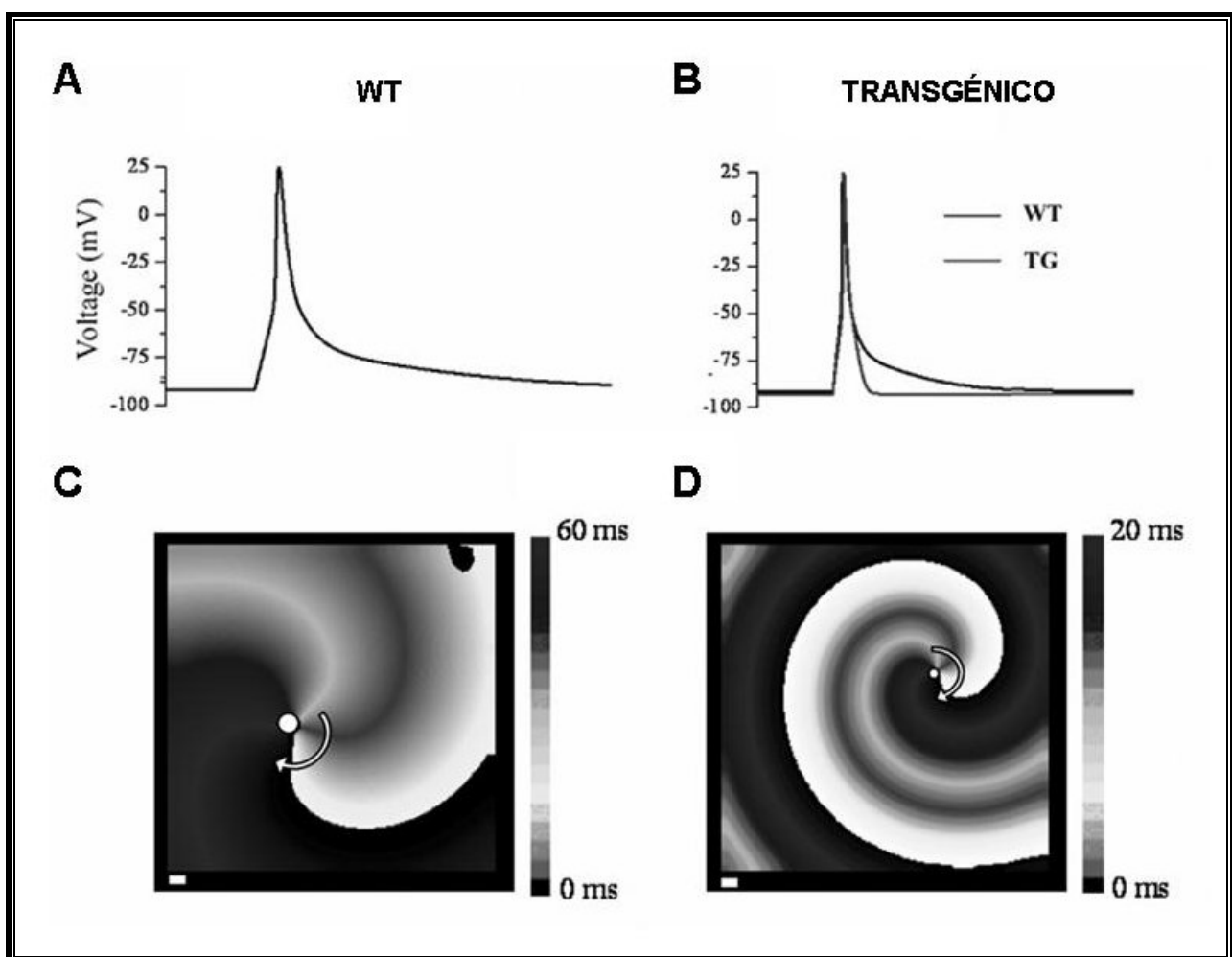
corrientes estudiadas. En otro estudio en ratón (Lomax y cols., 2003) se comparaban las corrientes tiempo- y voltaje-dependientes de  $K^+$  de ambas aurículas, siendo mayores en la AI que en la AD, lo que justificaba que la DPA registrada fuera significativamente más corta en los miocitos de la AI que en los de la AD. En lo que respecta a los humanos, un estudio que comparaba la  $I_{K1}$  de la AD y la AI de pacientes con FA paroxística y en RS (Voigt y cols., 2010), concluyó que existe un gradiente AI-AD de densidad de  $I_{K1}$  que probablemente contribuye a la existencia de focos de actividad a altas frecuencias en la AI de los pacientes con FA paroxística, ya que un aumento en la densidad de la  $I_{K1}$  abrevia la DPA e hiperpolariza los miocitos auriculares, aumentando la disponibilidad de canales de  $Na^+$ , lo que facilita la estabilización y la aceleración de los rotores que mantienen la FA. En el año 2010 un estudio de nuestro grupo de trabajo comparó las corrientes repolarizantes de los miocitos de la AI con los de la AD de pacientes con FA crónica (Caballero y cols., 2010b). Los datos permitieron concluir que existen unas notables diferencias fisiológicas en las propiedades eléctricas de ambas aurículas (diferencias inter-auriculares) así como entre los miocitos de cada aurícula (intra-auriculares). La FA por su parte aumenta dicha disparidad creando un gradiente entre la AD y la AI en lo que respecta a la densidad de la  $I_{to}$ , mientras que abole el gradiente fisiológico AD-AI en lo que respecta a la  $I_{Kur}$ . A su vez, aumenta, multiplicando por casi 3, la densidad de la  $I_{Ks}$  lo que contribuye de forma crítica al acortamiento de la DPA en ambas aurículas.

#### 6.4. Papel de los canales iónicos

Muchas evidencias demuestran que la interacción entre la  $I_{K1}$  y la  $I_{Na}$  controla la formación, estabilidad y frecuencia de los rotores. La  $I_{CaL}$  también parece jugar un papel en el control de la frecuencia de los rotores y en el paso de FV a taquicardia ventricular. Por lo que respecta a las corrientes de salida de  $K^+$  dependientes de voltaje parece importante el papel de la  $I_{Ks}$  en la estabilización de los rotores (Caballero y cols., 2010b).

El papel fundamental de la  $I_{K1}$  se ha demostrado tanto en modelos computacionales como en animales. La  $I_{K1}$  se encuentra aumentada en pacientes con FA, debido a un marcado aumento en la expresión de los canales Kir2.1, responsables de la generación de esta corriente y a un aumento en la probabilidad de apertura del canal, que podría explicarse por alteraciones en el grado de defosforilación del canal (Michael y cols., 2009; Workman y cols., 2001; Dobrev y cols., 2001; Gaborit y cols., 2005; Voigt y cols., 2010). En modelos animales la inhibición de la  $I_{K1}$  con  $BaCl_2$  detenía o frenaba la la FV (Warren y cols., 2003). Simulaciones computacionales para estudiar las consecuencias del aumento de la  $I_{K1}$  muestran rotores más rápidos que se desplazan menos y más

estables (Pandit y cols., 2005). La estabilización de los rotores se debía a un acortamiento de la DPA y un aumento de la excitabilidad cardiaca por una mayor disponibilidad de la  $I_{Na}$ , producida a su vez por la hiperpolarización del potencial de membrana de reposo (Tabla II.9). Esto mismo se demostró posteriormente en ratones transgénicos donde la  $I_{K1}$  se sobreexpresaba: los rotores se mantenían extremadamente rápidos (50-60 Hz) durante más de 100 minutos, mientras que los rotores generados en los animales control tenían una frecuencia de giro mucho más lenta (10-20 Hz) y duraban menos (10 segundos) (Li y cols., 2004; Pandit y cols., 2005; Noujaim y cols., 2007b) (Figura II.42). Estos datos estimularon la búsqueda de fármacos que pudieran inhibir de forma selectiva la  $I_{K1}$ . Por ello, se describieron los determinantes moleculares de los fármacos capaces de



**Figura II.42. Consecuencias de la sobreexpresión transgénica de  $I_{K1}$  en las características del PA, reentrada, longitud de onda y frecuencia.** (A) Simulación de un PA de un miocito ventricular de ratón WT. (B) Simulación de un PA de un miocito ventricular de ratón transgénico (TG) (gris) superpuesto encima de un PA de un miocito ventricular de ratón WT (negro), donde se observa una aceleración de la repolarización en la fase 3 en el PA transgénico respecto al WT. (C) Simulación de la reentrada capa de miocitos ventriculares de ratón WT y (D) transgénico. La sobreexpresión de  $I_{K1}$  reduce la extensión espacial del estado excitado (longitud de onda) e incrementa la frecuencia de rotación (WT, 13 Hz; TG, 40 Hz). [Adaptada de Vaquero y cols., 2008]

unirse a los receptores farmacológicos presentes en los canales Kir2.1-2.3 (Gómez y cols., 2008; Caballero y cols., 2010a; Amorós y cols., 2013).

El gradiente de frecuencias que existe entre la AD y la AI en la FA en presencia de acetilcolina se debe a distintas densidades de la  $I_{K_{ACh}}$  en ambas cámaras (Sarmast y cols., 2003). La activación de la  $I_{K_{ACh}}$  produce una aceleración y estabilización del rotor en FA aguda (Sarmast y cols., 2003; Atienza y cols., 2006) aunque en FA crónica, su papel es insignificante comparado con la  $I_{K1}$ .

La corriente  $I_{Na}$  determina la excitabilidad cardiaca y el inicio del potencial de acción y es la principal corriente que conduce el frente de onda en su propagación normal, y también cuando se produce un rotor. El papel de la  $I_{Na}$  en la dinámica de los rotores se ha analizado directamente usando TTX (Mandapati y cols., 1998; Kneller y cols., 2005), o indirectamente elevando las concentraciones de  $K^+$  extracelular (Pandit y cols., 2010; Pandit y cols., 2011) o simulando condiciones de isquemia (que limita la disponibilidad de la corriente por despolarizar el Em) (Mandapati y cols., 1998). En todos los casos, la inhibición de la  $I_{Na}$  termina los rotores eliminando la fibrilación por tres mecanismos: 1) por un alargamiento del centro de rotación (*core*); 2) por pérdida de capacidad del rotor de anclarse a obstáculos funcionales, que termina por extinguirse en los límites; y 3) por una disminución del número de ondas secundarias que serían capaces de generar nuevos rotores (Kneller y cols., 2005) (Tabla II.9).

| Corrientes                      | Acción     | Frecuencia | VC                      | DPA          | WL | Tamaño del "core" | Estabilidad |
|---------------------------------|------------|------------|-------------------------|--------------|----|-------------------|-------------|
| $I_{Na}$                        | Inhibición | ↓          | ↓                       | ↓            | ↓  | ↑                 | ↑           |
| ( $I_{K1}$ ,<br>$I_{K_{ACh}}$ ) | Aumento    | ↑          | ↓ (cerca del<br>"core") | ↓            | ↓  | ↑                 | ↑           |
| $I_{Ca,L}$                      | Inhibición | ↓↑         | ?                       | ↓            | ↓  | ↓↑                | ↑           |
| $I_{to}$ , $I_{Kur}$            | Inhibición | ?          | ?                       | ↑("plateau") | ↑  | ?                 | ↓?          |
| $I_{Ks}$                        | Inhibición | ↓=         | ?                       | ↑            | ↑  | ?                 | ↑           |
| $I_{Kr}$                        | Inhibición | ?          | ?                       | ↑            | ↑  | ?                 | ?           |

**Tabla II.9. Efectos de cada corriente iónica por separado en la dinámica de los rotores.** VC, "core" (centro de rotación), WL (longitud de onda). [Adaptada de Vaquero y cols., 2008]

La concentración de calcio intracelular parece importante en el inicio de la actividad espontánea en TdP y en arritmias hereditarias como la taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica, que puede ser el inicio de rotores y fibrilación (Choi y cols., 2002; Cerrone y cols., 2007). Sin embargo el papel de la  $I_{Ca,L}$  es controvertido. Algunos autores muestran que el inhibición de la corriente con verapamilo produce una estabilización de los rotores por una mayor fragmentación de las ondas, y convierte la FV en taquicardia ventricular; mientras que otros estudios atribuyen estos efectos a la inhibición de la corriente  $I_{Kr}$ , también inhibida por el verapamilo a esas concentraciones (Zhang y cols., 1999; Noujaim y cols., 2007a; Noujaim y cols., 2007b) (Tabla II.9).

Por lo que respecta a las corrientes de salida de  $K^+$ , (Pandit y cols., 2005), el grupo de Jalife demostró que el rotor se terminaba inhibiendo selectivamente en un 90% la corriente auricular ultrarrápida de rectificación tardía  $I_{Kur}$  o la corriente transitoria de salida  $I_{to}$ , pero no los componentes rápido y lento de la corriente de salida de K con rectificación tardía  $I_{Kr}$  e  $I_{Ks}$ . La prolongación del potencial de acción auricular producido por esta inhibición produjo la parada del rotor. Además a pesar de que la inhibición de la  $I_{Kr}$  e  $I_{Ks}$  no produjese el fin del rotor, la inhibición de ambas a la vez, sí. El hecho de que la inhibición de la  $I_{Kur}$  por sí solo sea capaz de terminar el rotor es especialmente interesante ya que es una corriente específica de la aurícula y se puede evitar así los efectos proarrítmicos como las TdP asociadas a la inhibición de la  $I_{Kr}$  (Nattel, 1998; Nattel y cols., 1999) (Tabla II.9).

### 6.5. Futuro, implicaciones y perspectivas

Visto el grado de implicación de las distintas corrientes, especialmente la  $I_{Na}$  e  $I_{K1}$ , en las arritmias fibrilatorias, parece fundamental encontrar fármacos antiarrítmicos eficaces que puedan modificar estas corrientes, y por tanto el funcionamiento de los rotores. La inhibición de estas corrientes puede tener efectos en la frecuencia y velocidad de los rotores.

Noujaim y cols. compararon los efectos de la cloroquina y la quinidina en el bloqueo de los rotores. Si bien ambos conseguían reducir la frecuencia de los rotores en ratones que sobreexpresaban  $I_{K1}$  (de 48 Hz a 28 Hz con la quinidina y a 4 Hz con la cloroquina) sólo la cloroquina era capaz de volver a ritmo sinusal en todos los casos estudiados. El éxito de la cloroquina para terminar la fibrilación se atribuye a una unión a Kir2.1 más estable a la parte citoplasmática. La cloroquina además parece inhibir preferentemente la  $I_{K1}$  ( $I_{K1} > I_{Kr} > I_{Na} > I_{CaL}$ ) (Sánchez-Chapula y cols., 2001). Sin embargo, hay evidencias de que la quinidina bloquea también la  $I_{Na}$ ,  $I_{CaL}$ ,  $I_{to}$ ,  $I_{Kr}$ ,  $I_{Ks}$ ,  $I_{Kur}$ , e  $I_{K1}$  (Clark y cols., 1995). En otros modelos como el de oveja, la

cloroquina también redujo la frecuencia de los rotores y restauró el ritmo sinusal (Filgueiras-Rama y cols., 2012).

Los datos en distintos modelos animales sobre la eficacia de la inhibición de la  $I_{Na}$ , para producir el cese de los rotores (Comtois y cols., 2008) son controvertidos. Algunos sugieren que los bloqueantes de los canales de sodio son inefectivos para terminar la fibrilación porque reducen la longitud de onda disminuyendo la conducción (Nattel, 2002). De hecho, no solo no terminarían la fibrilación sino que la mantendrían (Asano y cols., 1997) o incluso convierten la fibrilación en taquicardia (Pandit y Jalife, 2013). Sin embargo, otros estudios demuestran su eficacia para prevenir y terminar la FA aún sin aumentar la longitud de onda (Wijffels y cols., 2000). El hecho cierto es que tanto flecainida como propafenona (los más potentes inhibidores de los canales de  $Na^+$ ) son los fármacos de elección para la cardioversión farmacológica de la FA de reciente comienzo en pacientes sin patología estructural por su seguridad y eficacia.

Otro estudio del grupo de Kodama muestra los beneficios antiarrítmicos de enfriar el miocardio ya que reduce la frecuencia y desestabiliza los rotores que acaban por extinguirse (Yamazaki y cols., 2012).



# **III. Hipótesis de Trabajo y Objetivos**



Tal y como se ha mencionado existe una modulación recíproca positiva entre los canales Nav1.5 y Kir2.1. De esta forma el aumento o la disminución en la expresión de canales Kir2.1 produce un aumento o disminución en la expresión de canales Nav1.5 y, viceversa. Este hallazgo tiene importantísimas repercusiones funcionales. El paradigma aceptado hasta ahora en Fisiología es que la excitabilidad cardiaca depende de la magnitud de la  $I_{Na}$  y, ésta a su vez, del nivel de potencial de reposo. El potencial de reposo por su parte, como ya se ha mencionado, depende de la magnitud de la  $I_{K1}$ . La modulación recíproca del nivel de expresión de canales Nav1.5 y Kir2.1 implica que la relación entre las corrientes  $I_{Na}$  e  $I_{K1}$  no sólo es funcional. Más aún, hoy en día se acepta que la  $I_{Na}$  y la  $I_{K1}$  determinan de forma crítica la estabilidad y velocidad de giro de los frentes de reentrada espirales (rotores) responsables de la génesis de las arritmias fibrilatorias tanto a nivel auricular como ventricular. Sin embargo, es importante destacar que hasta el momento se desconocen los determinantes moleculares y los mecanismos celulares responsables de la modulación recíproca positiva. Por otra parte, también se desconoce si se produce modulación recíproca positiva entre los canales Nav1.5 y los Kir2.2 y Kir2.3. Este hecho tiene una gran relevancia funcional, considerando que la  $I_{K1}$  ventricular es generada por canales Kir2.1/Kir2.2, mientras que en la  $I_{K1}$  auricular los canales Kir2.3 parecen jugar un papel predominante. Por otro lado, se ha descrito que las proteínas de anclaje (*scaffolding proteins*) SAP97 y  $\alpha 1$ -sintrofina determinan la localización y regulan la función de los canales Nav1.5 y Kir2.x en los miocitos cardiacos. Estas proteínas de anclaje se unen, a través de sus dominios PDZ, a las secuencias consenso S/T-X-V/I/L, que se encuentran localizadas preferentemente en el extremo C-terminal de los canales. De hecho, SAP97 se une con la misma afinidad a los tres canales de la familia Kir2.x, mientras que la  $\alpha 1$ -sintrofina, se une con mayor afinidad a Kir2.1 y Kir2.2 que a Kir2.3. Por tanto, dada la importancia de dichas proteínas de anclaje en la expresión y función de los canales Nav1.5 y Kir2.x, nuestra hipótesis es que podrían estar involucradas en la modulación recíproca positiva.

Considerando los antecedentes expuestos, el Objetivo **GENERAL** de la presente **TESIS DOCTORAL** es identificar los determinantes moleculares y los posibles mecanismos celulares responsables de la modulación recíproca positiva entre canales Nav1.5 y Kir2.1 y, si la hubiere, entre canales Nav1.5 y Kir2.2/Kir2.3. Para ello se han realizado experimentos de electrofisiología, así como experimentos de biología molecular (co-inmunoprecipitaciones, ensayos de ligación por proximidad, etc) en líneas celulares de mamífero y en miocitos cardiacos.

Los **OBJETIVOS ESPECÍFICOS** de la presente **TESIS DOCTORAL** son:

1. Analizar los efectos de la expresión de los canales cardiacos humanos Nav1.5 sobre la corriente  $I_{K1}$  generada por homo- y heterotetrámeros de los canales cardiacos humanos Kir2.1, Kir2.2 y Kir2.3 en sistemas de expresión heterólogos.
2. Identificar el papel de las proteínas de anclaje  $\alpha$ 1-sintrofina y SAP97 en la modulación recíproca positiva entre canales Nav1.5 y Kir2.x en sistemas de expresión heterólogos, en miocitos ventriculares de rata y en muestras auriculares humanas y de tejido cardiaco de ratón, rata y cobayo.
3. Determinar la repercusión funcional de la modulación recíproca positiva entre los canales Nav1.5 y Kir2.x en miocitos auriculares de pacientes en ritmo sinusal y con fibrilación auricular crónica en los que la  $I_{K1}$  aumenta como consecuencia del remodelado eléctrico.
4. Identificar los determinantes moleculares de la modulación recíproca positiva entre canales Nav1.5 y Kir2.x utilizando diversos mutantes localizados en los dominios N- y C-terminales de dichos canales.

## **IV. Material y Métodos**



## 1. TÉCNICA DE FIJACIÓN DE VOLTAJE EN PARCHE DE MEMBRANA (*PATCH-CLAMP*)

La técnica de fijación de voltaje comenzó a utilizarse en los años 80 para el registro de corrientes iónicas en células aisladas y se caracteriza por permitir mantener de forma estable el potencial de parte o de toda la membrana de la célula y registrar la corriente generada a través de los canales iónicos tras la aplicación de un pulso hiper o despolarizante (Hamill y cols., 1981). Esta técnica se basa en la formación de un sello de alta resistencia (un “gigasello” de  $\approx 2 \text{ G}\Omega$ ) entre la luz de una micropipeta de vidrio y la membrana de una célula (Figura IV.1). La micropipeta se llena con una solución iónica (“solución interna”) cuya composición varía en función de la corriente objeto de estudio. A través de la micropipeta, se inyecta la corriente necesaria para fijar el  $E_m$  al valor deseado y, al mismo tiempo, se registra la corriente generada tras la aplicación de pulsos hiper o despolarizantes (Hamill y cols., 1981). La técnica de fijación de voltaje presenta diferentes configuraciones (Figura IV.2):

- a) Configuración de parche sobre célula entera, *cell-attached* u *on-cell patch*.
- b) Configuración de célula entera o *whole-cell patch*.
- c) Configuración de parche interior-fuera o *inside-out patch*.
- d) Configuración de parche exterior-fuera o *outside-out patch*.



**Figura IV.1. Formación de un sello de alta resistencia.** Se muestran una micropipeta de vidrio y una célula CHO en el transcurso de la formación de un sello de alta resistencia o “gigasello”.

Una vez que se ha puesto en contacto la micropipeta con la superficie de la membrana celular, se aplica una ligera succión, con lo que la porción de la membrana incluida en la luz de la micropipeta se invagina y se forma el sello de alta resistencia. Ésta es la configuración de “parche de membrana sobre célula entera” (*cell-attached* u *on-cell patch*) que permite el registro de la corriente iónica unitaria o microscópica ( $i$ ), generada por la activación de un único canal (*single*

*channel*) presente en el parche de membrana. Esta configuración presenta la ventaja de ser la más fisiológica de las cuatro mencionadas porque no modifica el medio intracelular y es la más adecuada para estudios que requieran la participación de todos los sistemas celulares moduladores

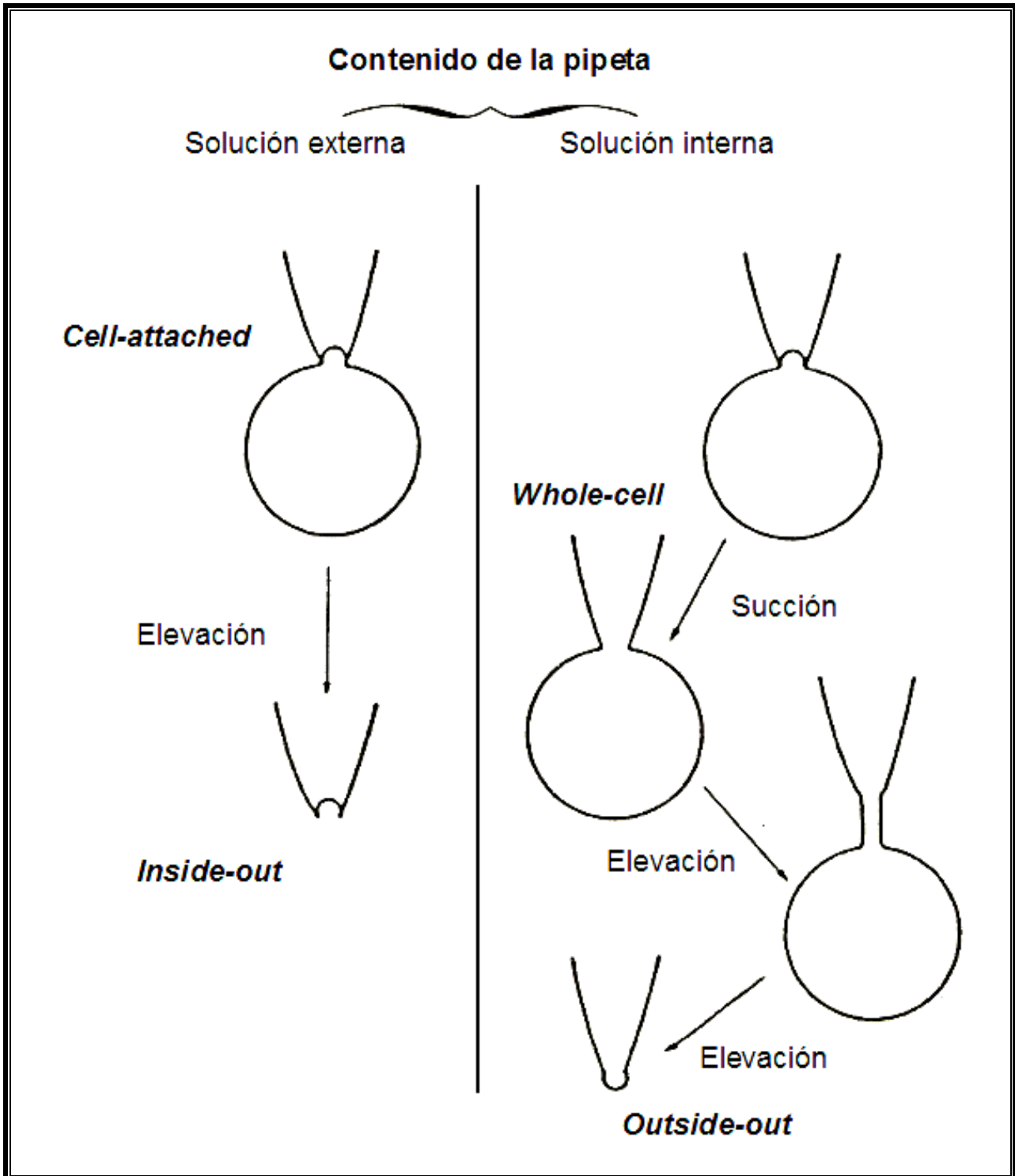


Figura IV.2. Configuraciones de la técnica de *patch-clamp*. Diagrama que ilustra la metodología para conseguir las diferentes configuraciones de los sellos mediante la técnica de *patch-clamp*.

del canal iónico. Su principal desventaja es que no permite determinar el PR (un indicador de la situación fisiológica de la célula) ya que los valores a los que se fija son relativos al potencial de membrana de la célula. Este problema se minimiza perfundiendo las células con una solución externa despolarizante que mantiene el PR celular en 0 mV.

A partir de la configuración de parche de membrana sobre célula entera, y aplicando una ligera succión adicional, se puede romper la porción de membrana invaginada en la luz de la micropipeta y conseguir la configuración de “célula entera” (*whole-cell patch*). Tras la ruptura del parche de membrana, la solución interna de la micropipeta entra en contacto con el medio intracelular y, al ser mucho mayor su volumen en comparación con el volumen intracelular, se produce un recambio casi inmediato de la composición del mismo, es decir, se produce una diálisis intracelular. En estas condiciones es posible fijar el  $E_m$  al valor deseado y, tras la aplicación de los protocolos experimentales adecuados, registrar la corriente iónica resultante de la actividad de todos los canales presentes en la membrana celular o corriente macroscópica ( $I$ ). Esta configuración permite controlar y modificar a voluntad el medio intracelular, pero también diluye los mediadores intracelulares responsables de la regulación de los canales iónicos. Para minimizar este problema, la solución interna de la micropipeta se complementa con ATP y otros mediadores que, en condiciones fisiológicas, mantienen la función de los canales iónicos. Otra posibilidad para minimizar la dilución de los mediadores celulares es utilizar la configuración de “parche de membrana perforado”. Para ello, se añade a la solución interna un antibiótico (nistatina o anfotericina B) que, una vez que se ha formado el sello de alta resistencia, va formando pequeños poros en la membrana de la célula, permitiendo así el paso de iones monovalentes. De esta forma, la resistencia de acceso va disminuyendo paulatinamente, mientras que la amplitud de la corriente registrada va aumentando, hasta que ambos parámetros alcanzan valores estables al cabo de  $\approx 30$  minutos, momento en el se empieza a registrar la corriente iónica objeto de estudio.

Partiendo de la configuración de parche de membrana sobre célula entera (*cell-attached*), y elevando la célula del fondo del baño, se puede separar el parche de membrana incluido en la luz de la micropipeta del resto de la célula, quedando así el lado citosólico de la membrana expuesto al medio externo y el lado extracelular en contacto con la solución interna de la micropipeta. Ésta es la configuración de “parche de membrana interior-fuera” (*inside-out patch*).

La última configuración es la de “parche de membrana exterior-fuera” (*outside-out patch*) que se obtiene a partir de la configuración de célula entera (*whole-cell*). En esta configuración, la cara extracelular de la membrana es la que queda en contacto con la solución externa. Estas dos últimas configuraciones son las también llamadas “de parche escindido” y permiten el registro de corrientes unitarias y macroscópicas en macroparches. Ambas son adecuadas para el estudio del mecanismo

de acción de fármacos o mediadores que actúen selectivamente sobre las superficies extra o intracelular de la membrana. Sin embargo, presentan el inconveniente de que desligan los canales iónicos del contenido citosólico que modula su actividad.

En la presente Tesis Doctoral, la  $I_{Kir2.x}$ , la  $I_{K1}$ , la  $I_{Nav1.5}$  y la  $I_{Na}$  fueron registradas utilizando la configuración de célula entera (*whole-cell*) de la técnica de *patch-clamp*.

## **2. REGISTRO DE $I_{Kir2.x}$ E $I_{Nav1.5}$ EN SISTEMAS DE EXPRESIÓN HETERÓLOGOS**

En esta Tesis Doctoral hemos utilizado como sistema de expresión heterólogo células de ovario de hámster chino (CHO). Son líneas celulares de mamífero en las cuales se transfectaba de forma transitoria el ADN complementario (ADNc) de los canales Kir2.x y Nav1.5 de humano (hKir2.x y hNav1.5) (WT y mutantes), así como proteínas accesorias.

### **2.1. Mutagénesis dirigida de los canales hKir2.x y hNav1.5**

El vector de expresión con el ADNc del canal hKir2.1 WT fue proporcionado por el Dr. J. Jalife, de la Universidad de Michigan (Ann Arbor, MI, EEUU). El canal hKir2.1 WT fue clonado de tejido humano, amplificado mediante PCR e incorporado al vector pcDNA3.1 para su expresión en líneas celulares de mamífero (Priori y cols., 2005).

El vector de expresión con el ADNc del canal hKir2.3 fue proporcionado por el Dr. J. A. Sánchez-Chapula, de la Universidad de Colima (Colima, México). El canal fue amplificado por PCR e incorporado al vector pcDNA3.1 para su expresión en líneas celulares de mamífero (Rodríguez-Menchaca y cols., 2008).

El vector de expresión pCMV6-XL4 con el ADNc del canal hKir2.2 fue adquirido en la empresa Origene (USA).

Los vectores de expresión con el ADNc de la subunidad  $\alpha$  del canal de sodio cardíaco (Nav1.5) y la subunidad  $\beta 1$  fueron proporcionados por la Dra. Connie R. Bezzina (Universidad de Amsterdam, Holanda). Las subunidades fueron amplificadas por PCR e incorporadas al vector pCGI para su expresión en líneas celulares de mamífero (Casini y cols., 2007; Watanabe y cols., 2008).

Todas las mutaciones de los canales hKir2.x y hNav1.5 (Tabla IV.1) se realizaron con el kit QuikChange Site-Directed Mutagenesis (Stratagene, La Jolla, CA, EEUU) y fueron confirmadas mediante la secuenciación completa y en ambas direcciones de la región codificante de las dos cadenas de ADN. El plásmido que codificaba para el extremo N-terminal (Nter) de la subunidad  $\alpha$

del canal de sodio cardíaco (132 aminoácidos) fue diseñado mediante la sustitución del codón que codifica para el aminoácido 133 (TTC) por un codón stop (TAG).

| Proteína    | Mutaciones                                 | Objetivo   |
|-------------|--|--|
| Kir2.1      | p.E426A, p.E426S-I427V                     | Estudio del dominio de unión a PDZ   |
| Kir2.2      | p.E432A                                    | Estudio del dominio de unión a PDZ   |
| Kir2.3      | p.A444E                                    | Estudio del dominio de unión a PDZ   |
| Nav1.5      | $\Delta$ PDZ, p.S20A, p.S20A- $\Delta$ PDZ | Estudio del dominio de unión a PDZ   |
|             | F133stop                                   | Péptido N-terminal   |
| Nter Nav1.5 | R18A, E19A, S20A, L21A, S20D               | Estudio de los determinantes moleculares del posible dominio de unión a PDZ en el Nter de Nav1.5 |

**Tabla IV.1. Mutantes de Kir2.x y Nav1.5 que se diseñaron en nuestro laboratorio para la realización de la presente Tesis Doctoral.** Las mutaciones separadas por “-” están contenidas en el mismo plásmido. La mutación  $\Delta$ PDZ se refiere a la eliminación del motivo de unión a dominios PDZ en Nav1.5 (3 últimos aa, SIV).

## 2.2. Cultivo y transfección de los canales hKir2.x y hNav1.5 en células CHO

Para el cultivo de las células CHO se emplearon placas de 60 mm de diámetro con medio Ham-F12 suplementado con suero fetal bovino al 10% y una mezcla de antibióticos (100 U/mL de penicilina y 100  $\mu$ g/ml de estreptomycin) (Caballero y cols., 2010a; Amorós y cols., 2013; Dolz-Gaitón y cols., 2013; Gómez y cols., 2014). Todas las líneas celulares se mantenían a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y se pasaron cada 4-5 días mediante un breve tratamiento con tripsina (0.5 mg/ml) (Caballero y cols., 2010a; Amorós y cols., 2013; Dolz-Gaitón y cols., 2013; Gómez y cols., 2014).

Para el estudio electrofisiológico, las células CHO se transfectaron de forma transitoria con el vector de expresión que contenía el gen del canal hKir2.x (WT o mutante) (1.6  $\mu$ g) solo o junto con

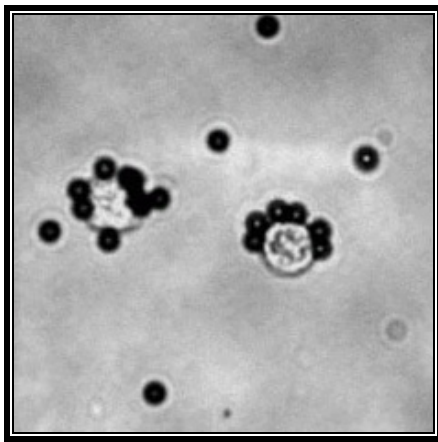
el canal hNav1.5 (WT o mutante) y hNav $\beta$ 1 (1.6  $\mu$ g) (Nav1.5- $\beta$ ) más el ADNc que codifica para el antígeno CD8 (0.5  $\mu$ g).

Los experimentos de coexpresión (Kir2.1/Kir2.2, Kir2.1/Kir2.3, Kir2.2/Kir2.3) se llevaron a cabo usando una relación de 0.5:0.5 o de 0.5:0.5:1:1 cuando se cotransfectaban Nav1.5- $\beta$ . Las cinéticas de activación obtenidas gracias al ajuste de una ecuación monoexponencial al trazo de corriente registrado a -120 mV de los tres canales Kir2.x homotetraméricos, son significativamente distintas entre sí, de tal forma que la cinética de activación más lenta es la de Kir2.3. Debido a esta característica, las cinéticas de activación de las corrientes generadas por heterotetrámeros de Kir2.x son intermedias respecto a las cinéticas de las corrientes generadas por canales homotetraméricos. En estos experimentos únicamente se consideraron como válidos aquellos cuyas corrientes tenían una cinética de activación intermedia.

Las células CHO representan un buen modelo para el estudio de canales de K<sup>+</sup>, ya que no presentan ninguna corriente de este tipo (Yu y Kerchner, 1998). Sin embargo, sí presentan una pequeña proporción de canales de Na<sup>+</sup> endógenos (Lalik y cols., 1993), aunque la amplitud de las corrientes generadas a través de los mismos es demasiado pequeña para interferir en el registro de las corrientes de K<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup> generadas por los canales hKir2.x y hNav1.5.

Para la transfección se utilizó el método del XtremeGENE HP (Roche Diagnostics, Barcelona, España). Este método de transfección consiste en la incubación de una mezcla de XtremeGENE HP, del vector o vectores de expresión con el gen del canal y del ADNc del antígeno de superficie CD8 expresado en el vector EBOPcD Leu-2 (0.5  $\mu$ g), en presencia de medio de cultivo Ham-F12 sin suero y sin antibiótico. El XtremeGENE HP está compuesto por una mezcla de lípidos que propicia que el ADNc se incorpore a las células y permitir así la expresión en la membrana de los canales objeto de estudio. Con estos vectores de expresión, una mezcla con una relación de 3 volúmenes de XtremeGENE HP (en  $\mu$ L) por cada volumen de ADNc (en  $\mu$ g) se demostró como la mejor para obtener la mayor cantidad de células transfectadas. Tras incubar la mezcla durante 30 minutos, ésta se añadía a las células CHO mantenidas en medio Ham-F12 con suero y con antibiótico, permitiendo que el ADNc adherido al XtremeGENE HP se introdujese en las células. Transcurridas 48 horas, tiempo durante el cual se producía la transcripción del ADNc y la expresión en la membrana de los canales, las células se barrían de la placa con rascadores de goma, procedimiento mediante el cual la mayoría de las células permanecen intactas. Tras dejar reposar la suspensión de células durante 1 hora a temperatura ambiente, se comenzaban los experimentos electrofisiológicos durante las 12 horas siguientes (Caballero y cols., 2010a; Amorós y cols., 2013; Dolz-Gaitón y cols., 2013; Gómez y cols., 2014).

Para la selección de las células que habían incorporado los vectores, éstas se incubaron con una solución de microesferas de poliestireno unidas a anticuerpos anti-CD8 (Dynabeads M-450; DYNAL, Oslo, Noruega). Los anticuerpos anti-CD8 se unen a las células que presentan en su membrana el antígeno de superficie CD8, células que, en la mayoría de los casos, también presentan el canal objeto de estudio (Caballero y cols., 2010a; Amorós y cols., 2013; Dolz-Gaitón y cols., 2013; Gómez y cols., 2014). De este modo, para la realización de los experimentos, las células se seleccionaban mediante su observación al microscopio por la presencia en la membrana de las microesferas de poliestireno (Figura IV.3).



**Figura IV.3. Identificación de las células CHO que expresan el antígeno CD8 en su membrana.** Células CHO transfectadas con el plásmido EBO-pcD leu2 identificadas mediante anticuerpos anti-CD8 unidos a microesferas de poliestireno (DynaBeads M-450).

### 2.3. Silenciamiento de SAP97 y $\alpha$ 1-sintrofina en células CHO

Hace casi 20 años se describió por primera vez el uso de *dsRNAs* (*double stranded RNA*, ARN de doble cadena) como *RNAi* (*RNA interference*, ARN de interferencia) para el silenciamiento de un determinado gen en *Caenorhabditis elegans* (Fire y cols., 1998). Poco después se observó que los *dsRNAs* eran procesados a *siRNAs* (*small interfering RNAs*), que son los ARNs de doble cadena de unos 25 nucleótidos de longitud, realmente encargados de inhibir la expresión de genes (Hamilton y cols., 1999; Zamore y cols., 2000). Posteriormente, se demostró que se podían silenciar genes de células en cultivo mediante la transfección de *siRNAs* sintéticos con agentes lipídicos (Elbashir y cols., 2002). En ese mismo año se utilizaron por primera vez *shRNAs* (*short hairpin RNAs*), que son dúplex de *siRNAs* unidos por una horquilla y sintetizados por la propia célula como una sola hebra de ARN a partir de ADNc introducido en un plásmido, para inhibir la expresión de genes (Yu y cols., 2002). Dado que los miocitos tienen un bajo índice de transfección al utilizar agentes lipídicos, el silenciamiento de genes en estas células se suele llevar a cabo mediante la infección con virus que codifican para *shRNAs* (ver apartado 4.2), mientras que el silenciamiento de genes en

líneas celulares como CHO se puede hacer perfectamente transfectando *siRNAs* sintéticos con LipofectAMINE 2000. Por lo tanto, para el silenciamiento de  $\alpha$ 1-sintrofina y SAP97 en células CHO, se transfectaron diferentes *siRNAs* obtenidos a partir de la secuencia de  $\alpha$ 1-sintrofina (Acc. No. XM\_003501150.1) y de secuencias conservadas entre isoformas de SAP97 (Tabla IV.2), a una concentración final en placa de 50 nM con LipofectAMINE 2000 (Invitrogen, USA). Como control de silenciamiento se utilizó un *siRNA* control negativo universal de Sigma (SIC001) a 50 nM. Los experimentos de *western blot* demostraron que las proteínas se silenciaban en una proporción mayor al 70% a las 24 horas de la transfección. Por tanto, los experimentos de electrofisiología se llevaron a cabo 24 horas después de la transfección.

| Proteína              | siRNA        | Secuencia sentido ( 5'- 3') | Secuencia antisentido ( 5'- 3') |
|-----------------------|--------------|-----------------------------|---------------------------------|
| $\alpha$ 1-sintrofina | siRNA1 SNTA1 | GAGGUCUCACCGUAUUUCA         | UGAAAUAACGGUGAGACCUC            |
|                       | siRNA2 SNTA1 | CCUUGAAGAUGGCAUAUGU         | ACAUAUGCCAUCUUCAAGG             |
|                       | siRNA3 SNTA1 | CUGAGCAGGCCAGCCGUA          | UACGGGCUGGCCUGCUCAG             |
| SAP97                 | siRNA1 DLG1  | AGACAGCUUGGAGACACCAACUUUAU  | AUAAGUUGGUGUCUCCAAGCUGUCU       |
|                       | siRNA2 DLG1  | CCCAGGAUGGAAGAUUGCGAGUAAA   | UUUACUCGCAAUCUCCAUCCUGGG        |
|                       | siRNA3 DLG1  | CCUAGCAGUGAAUAGUGUAUGUUUA   | UAAACAUACACUAUUCACUGCUAGG       |
|                       | siRNA4 DLG1  | CAACCAUCUGUAUGGAACAAGUGUU   | AACACUUGUCCAACAGAUUGGUUG        |

Tabla IV.2. Secuencias de los *siRNAs* utilizados para silenciar SAP97 (DLG1) y  $\alpha$ 1-sintrofina (SNTA1) en células CHO.

## 2.4. Técnicas de registro en sistemas de expresión heterólogos

Para el registro de  $I_{Kir2.x}$  y  $I_{Nav1.5}$  en células CHO se colocaba una alícuota de la suspensión de las células transfectadas en una cámara de 0.5 ml montada sobre la platina de un microscopio invertido (Nikon TS100; Nikon Co., Tokio, Japón). Después de asentarse en el fondo de la cámara, las células fueron perfundidas con solución externa (ver composición más adelante) a una velocidad de flujo de  $\approx 1$  ml/minuto. Las corrientes se registraron a temperatura ambiente. Para la obtención de los registros se utilizó un amplificador Axopatch 200B (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EEUU). La generación de protocolos, la adquisición de datos y el análisis de los mismos fueron llevados a cabo mediante el uso del software PCLAMP 9.0 y de sus aplicaciones CLAMPEX y

CLAMPFIT (Molecular Devices). Las micropipetas empleadas en los registros fueron obtenidas a partir de tuboscapilares de borosilicato de 1.0 y 0.5 mm de diámetro exterior e interior, respectivamente (GD1; Narishige Co. Ltd., Tokio, Japón), utilizando un estirador horizontal de micropipetas programable (P-2000; Sutter Instruments Co., Novato, CA, EEUU). Posteriormente, las puntas de las micropipetas fueron pulidas en una microforja (MF-83; Narishige) hasta alcanzar el tamaño deseado. Para asegurar la calidad de la fijación del voltaje, la resistencia de las micropipetas utilizadas, una vez que se rellenaban con la solución interna y se sumergían en la solución externa, era inferior a 3.5 M $\Omega$  para el registro de  $I_{Kir2.x}$  o inferior a 1.5 M $\Omega$  para el de  $I_{Nav1.5}$ . Los artefactos de corriente capacitativa generados al aplicar pulsos simétricos de 10 mV fueron registrados a 50 kHz, filtrados a 10 kHz y posteriormente utilizados para el cálculo de la capacitancia, la resistencia de acceso y la impedancia de entrada a la célula. Posteriormente se optimizaron la capacitancia y las resistencias en serie; en la mayor parte de los casos se obtuvo una compensación en torno al 80%. La resistencia de acceso no compensada y la capacitancia de las células CHO fue de  $1.9\pm 0.1$  M $\Omega$ , y  $10.6\pm 0.85$  pF, respectivamente (n=717), mientras que la amplitud máxima media de la  $I_{Kir2.1}$ ,  $I_{Kir2.2}$ ,  $I_{Kir2.3}$ , e  $I_{Nav1.5}$  a -120 mV fueron de  $-1.2\pm 0.1$  (n=31),  $-0.7\pm 0.1$  (n=25),  $-0.3\pm 0.03$  nA (n=21), y  $-1.7\pm 0.2$  nA, respectivamente. Por tanto, en nuestras condiciones experimentales los errores de voltaje debidos a las resistencias en serie fueron mínimos (<5 mV). Además la baja capacitancia permitió un rápido control en la fijación de voltaje.

## 2.5. Registro de $I_{Kir2.x}$ e $I_{Nav1.5}$ : Soluciones y protocolos experimentales.

Para el registro de la corriente macroscópica generada por los canales hKir2.x así como la generada por los canales hNav1.5 en células CHO, la solución externa contenía (en mM): NaCl 136, KCl 4, CaCl<sub>2</sub> 1.8, MgCl<sub>2</sub> 1, HEPES 10, y glucosa 10 (ajustada a pH 7.4 con NaOH). Las micropipetas utilizadas para el registro se rellenaron con una solución interna cuya composición era (en mM): K-aspartato 80, KCl 42, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10, Mg-ATP 5, fosfocreatina 3, HEPES 5, y EGTA 5 (ajustado a pH 7.2 con KOH) para el registro de  $I_{Kir2.x}$  (*liquid junction potencial* (LJP)=-13.2 mV) o NaF 10, CsF 110, CsCl 20, HEPES 10, y EGTA 10 (ajustado a pH 7.35 con CsOH) para el registro de  $I_{Nav1.5}$ . Los voltajes se corrigieron según el LJP, o diferencia de potencial que se genera en función de las diferentes concentraciones de iones en las soluciones extra e intracelular del experimento (Neher, 1992; Gómez y cols., 2009; Caballero y cols., 2010a). Además para minimizar los cambios en las propiedades tiempo y voltaje dependientes de la corriente  $I_{Nav1.5}$ , los registros se realizaron después de 20 minutos de establecer la configuración de célula entera. En estas condiciones, la amplitud de la corriente y la dependencia de voltaje de la activación e inactivación

se mantenían estables durante el transcurso del experimento. Los valores del punto medio ( $V_h$ ) y la pendiente ( $k$ ) de las curvas conductancia-voltaje para  $I_{Nav1.5}$  registrados en células CHO fueron  $42.7 \pm 1.6$  mV and  $5.2 \pm 0.3$ , respectivamente, mientras que los de las curvas de inactivación fueron  $-80.9 \pm 1.1$  mV y  $6.0 \pm 0.3$ , respectivamente. Cabe destacar que la coexpresión de los canales Kir2.1 no modificaba la dependencia de voltaje de la activación e inactivación.

El protocolo para el registro de la  $I_{Kir2.x}$  en las células transfectadas consistía en la aplicación de pulsos de 250 ms en incrementos de 10 mV entre -120 mV y +20 mV. El potencial de fijación se mantuvo a -60 mV. Para la construcción de las relaciones corriente-voltaje (I-V) se representaba la amplitud de la corriente medida al final del pulso en función del potencial del pulso aplicado.

El protocolo para el registro de la  $I_{Nav1.5}$  en las células transfectadas consistía en la aplicación de pulsos de 50 ms en incrementos de 5 mV entre -80 mV y +50 mV. El potencial de fijación se mantuvo a -120 mV. Para la construcción de las relaciones corriente-voltaje (I-V) se representaba la amplitud de la corriente medida en el pico máximo en función del potencial del pulso aplicado.

Para determinar el  $E_{Na}$  (potencial de inversión para el  $Na^+$ ) las relaciones densidad de corriente-voltaje fueron ajustadas a la fórmula:

$$I_{Na} = (E_m - E_{Na}) * G_{max} * (1 + \exp[(E_m - V_h)/k])^{-1} \quad (IV.1)$$

donde  $I_{Na}$  es el pico de corriente en cada pulso al potencial deseado  $E_m$ ,  $G_{max}$  la conductancia máxima,  $V_h$  es el punto medio de la curva y  $k$  el valor de la pendiente. La dependencia de voltaje de la activación se estudió construyendo las curvas conductancia – voltaje (curvas de activación). Cada curva de activación se construyó representando el pico de conductancia normalizado en función del potencial de membrana. La conductancia ( $G$ ) fue calculada mediante la ecuación:

$$G = I_{Na}/(E_m - E_{Na}) \quad (IV.2)$$

donde  $G$  es la conductancia a un  $E_m$  dado,  $I_{Na}$  representa el pico máximo de corriente al  $E_m$  y  $E_{Na}$  es el potencial de inversión calculado mediante la ecuación IV.1.

La dependencia de voltaje de la inactivación se estudió construyendo las curvas de inactivación. Cada curva de inactivación se obtuvo mediante un protocolo de doble pulso. Primero se aplicaba un pulso de 500 ms de duración desde -140 mV hasta -20 mV en incrementos de 10 mV (potencial de fijación -120 mV), seguido de un pulso test a -20 mV. Las curvas de inactivación se construyeron representando la amplitud de corriente obtenida normalizada al pico de corriente máxima, en función del voltaje aplicado en cada pulso.

El ajuste mediante una función de Boltzmann a las curvas de activación como las de inactivación permitió obtener el punto medio y la pendiente de cada curva.

La amplitud de la corriente se normalizó dividiendo entre el valor de la capacitancia de cada célula para obtener la densidad de corriente.

La  $I_{K_{ir2.x}}$  y la  $I_{Na_{v1.5}}$  se registraron utilizando una frecuencia de muestreo de 4 y 50 kHz, respectivamente, se filtraron a la mitad de la frecuencia de muestreo y se guardaron en el disco duro de un ordenador para su posterior análisis. Los datos se analizaron usando el software pCLAMP (Molecular Devices).

### 3. REGISTRO DE $I_{K1}$ E $I_{Na}$ EN MIOCITOS AURICULARES HUMANOS

El protocolo del que se obtuvieron las muestras de orejuelas auriculares humanas fue aprobado por el Comité de Investigación del Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid (CNIC-13) y estaba en concordancia con los principios descritos en la Declaración de Helsinki. Las muestras de tejido auricular (orejuela derecha) se obtuvieron de pacientes en RS (n=9) y con FAC (n=6) que iban a ser sometidos a cirugías cardíacas que implicaban la utilización de una bomba extracorpórea. Antes de la operación, los pacientes recibieron y firmaron un consentimiento donde se les informaba de los fines experimentales a los que iba a ser destinada la muestra. Las características de dichos pacientes se resumen en la Tabla IV.3.

#### 3.1. Disociación enzimática de miocitos auriculares humanos

Para la disociación de las muestras se utilizó un protocolo descrito por el grupo de la Dra. Ursula Ravens (Dobrev y cols., 2001; Wettwer y cols., 2004; Dobrev y cols., 2005) y adaptado por nuestro grupo de investigación (Gómez y cols., 2009; Amorós y cols., 2010; Caballero y cols., 2010a; Caballero y cols., 2010b; González de la Fuente y cols., 2013; Amorós y cols., 2013; Gómez y cols., 2014; Barana y cols., 2014; Pérez-Hernández y cols., 2016).

Las muestras se obtenían en el quirófano y se transportaban en solución *Tyrode* “cero calcio” (*Tyrode* 0  $Ca^{2+}$ , de composición [en mM]: NaCl 100, KCl 10,  $KH_2PO_4$  1.2,  $MgSO_4$  5, taurina 50, MOPS 5, glucosa 20), complementada con 2,3-butanodiona monoxima (BDM) 30 ( $\approx 1 \text{ mm}^3$ ) y se realizaban 4 lavados de 3 minutos cada uno en *Tyrode* 0  $Ca^{2+}$ , en un baño a 37°C y con burbujeo de  $O_2$ . Una vez lavados, los trozos se mantuvieron en la misma solución a la que se añadía colagenasa tipo I (254 U/ml; Worthington Biochemical Corp., Lakewood, NJ, EEUU) y proteasa tipo XXIV (0.5 mg/ml; Sigma). Pasados 15 minutos, se añadía  $Ca^{2+}$  (0.2 mM) y se mantenía en las mismas

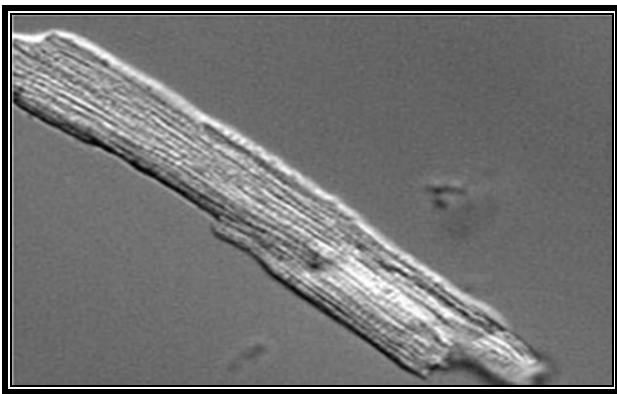
## Material y Métodos

condiciones de temperatura y burbujeo durante otros 30 minutos. Transcurrido este tiempo, el tejido se filtraba y se resuspendía en *Tyrode* 0.1 mM Ca<sup>2+</sup> en presencia de colagenasa, pero sin proteasa. Mientras la muestra se trataba sólo con colagenasa se tomaban alícuotas cada 2 minutos para su observación al microscopio. Cuando tanto el número de miocitos como su morfología eran los idóneos (Figura IV.4), se paraba la reacción enzimática.

|                                      | SR                    | CAF               |
|--------------------------------------|-----------------------|-------------------|
| Pacientes ( <i>n</i> )               | 9                     | 6                 |
| Edad (años)                          | 68±4                  | 73±2              |
| M/F ( <i>n</i> )                     | 6 (66.7%) / 3 (33.3%) | 3 (50%) / 3 (50%) |
| Cardiopatía                          |                       |                   |
| Valvular ( <i>n</i> )                | 2 (22.2%)             | 3 (50%)           |
| Isquémica ( <i>n</i> )               | 5 (55.6%)             | 0 (0%)            |
| Combinada ( <i>n</i> )               | 2 (22.2%)             | 3 (50%)           |
| Hipertensión ( <i>n</i> )            | 7 (77.7%)             | 4 (66.6%)         |
| Diabetes mellitus ( <i>n</i> )       | 4 (44.4%)             | 1 (16.4%)         |
| Dislipidemia ( <i>n</i> )            | 4 (44.4%)             | 2 (33.3%)         |
| Diámetro AI (cm)                     | 4.1±0.3               | 5.9±0.3**         |
| Fracción de eyección (%)             | 54.6±3.5              | 57.3±1.3          |
| Clase Funcional NYHA                 |                       |                   |
| I ( <i>n</i> )                       | 2 (22.2%)             | 1 (16.4%)         |
| II ( <i>n</i> )                      | 4 (44.4%)             | 2 (33.3%)         |
| III ( <i>n</i> )                     | 2 (22.2%)             | 3 (50%)           |
| IV ( <i>n</i> )                      | 1 (11.1%)             | 0 (0%)            |
| Creatinina (mg/dL)                   | 0.98±0.1              | 0.94±0.05         |
| Presión Sistólica Pulmonar (mm Hg)   | 39.7±8.4              | 53.2±8.4          |
| Tratamiento                          |                       |                   |
| Beta bloqueantes ( <i>n</i> )        | 6 (66.7%)             | 2 (33.3%)         |
| IECA/ARAII ( <i>n</i> )              | 7 (77.7%)             | 2 (33.3%)         |
| Estatinas ( <i>n</i> )               | 7 (77.7%)             | 2 (33.3%)         |
| Ácido acetilsalicílico ( <i>n</i> )  | 5 (55.6%)             | 1 (16.4%)         |
| Digoxina ( <i>n</i> )                | 0 (0%)                | 2 (33.3%)         |
| Antagonistas del calcio ( <i>n</i> ) | 4 (44.4%)             | 3 (50%)           |
| Diuréticos ( <i>n</i> )              | 3 (33.3%)             | 4 (66.6%)         |
| Anticoagulantes orales ( <i>n</i> )  | 0 (0%)                | 6 (100%)          |

**Tabla IV.3. Características de los pacientes.** RS, ritmo sinusal; FA, fibrilación auricular; M, masculino; F, femenino; AI, aurícula izquierda; NYHA, New York Heart Association; IECA, inhibidores del enzima de conversión de angiotensina II; ARAII, antagonistas de los receptores tipo 1 de la angiotensina II. \*  $P < 0.01$  vs. pacientes en RS.

A continuación, se resuspendía la muestra con un pipeteador durante 5 minutos en “solución de almacenamiento” (composición en mM: KCl 20, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10, glucosa 10, K-glutamato 70, ácido β-hidroxibutírico 10, taurina 10, EGTA 10 y albúmina 1 [ajustada a pH 7.4 con KOH]). Pasados esos 5 minutos se filtraba de nuevo la muestra y se volvía a resuspender en solución de almacenamiento. Por último, se añadían concentraciones crecientes de Ca<sup>2+</sup> en tres pasos: el primero para obtener una concentración de 0.2 mM; tras 10 minutos se aumentaba la concentración hasta 0.3 mM; y en el tercer paso, tras otros 10 minutos, se alcanzaba una concentración final de 0.5 mM.



**Figura IV.4. Miocito auricular humano disociado enzimáticamente en nuestro laboratorio.**

Los miocitos se dejaban reposar durante 1 hora a 4°C hasta su posterior utilización para la obtención de los registros electrofisiológicos, siempre dentro de las siguientes 8 horas.

### **3.2. Técnicas de registro de la $I_{K1}$ e $I_{Na}$ auriculares humanas**

El registro de las corrientes nativas en miocitos auriculares humanos se realizó de manera similar a como se ha explicado en el apartado 2.4 para el registro de corrientes en sistemas de expresión heterólogos. Todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente. Las micropipetas empleadas en estos registros fueron obtenidas como se ha descrito en el apartado 2.4. Su resistencia, una vez se rellenaban con la solución interna y se sumergían en la solución externa, era de 2-4 MΩ. El cálculo de la capacitancia, la resistencia de acceso y la impedancia de entrada a la célula se realizó como se ha descrito previamente para los sistemas de expresión heterólogos. En los miocitos auriculares humanos de RS los valores de la resistencia de acceso y de capacitancia celular fueron  $1.7 \pm 0.6$  MΩ, y  $76.8 \pm 5.6$  pF (n=70), respectivamente, mientras que la amplitud media máxima de  $I_{K1}$  (a -100 mV) y el pico de la amplitud máxima en el pico de  $I_{Na}$  fueron de  $-810 \pm 85$  y  $-2614 \pm 414$  pA respectivamente.

### 3.3. Registro de la $I_{K1}$ e $I_{Na}$ auriculares humanas: Soluciones y protocolos experimentales

Para el registro de la  $I_{K1}$  en miocitos auriculares humanos, la solución externa contenía (en mM): NaCl 100, KCl 40, CaCl<sub>2</sub> 1, MgCl<sub>2</sub> 1, HEPES 10, 4-aminopiridina (4-AP) 2, glucosa 10, y glibenclamida (10  $\mu$ M) (ajustada a pH 7.4 con NaOH). A dicha solución se le añadía nifedipino (1  $\mu$ M) y atropina (1  $\mu$ M) para inhibir la  $I_{Ca,L}$  e  $I_{K,ACH}$ , respectivamente. Las micropipetas utilizadas para el registro se rellenaron con una solución interna cuya composición era (en mM): K-aspartato 80, KCl 42, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10, Mg-ATP 5, fosfocreatina 3, HEPES 5 y EGTA 5 (ajustada a pH 7.2 con KOH).

En algunos experimentos, y para confirmar que la corriente registrada era  $I_{K1}$  se perfundía con una solución externa a la que se añadía BaCl<sub>2</sub> (100  $\mu$ M). En estas condiciones, se consideraba  $I_{K1}$  como la corriente sensible a BaCl<sub>2</sub> y su amplitud a los diferentes voltajes estudiados se calculaba como la diferencia entre la corriente total, registrada con la solución externa carente de BaCl<sub>2</sub>, y la corriente registrada en presencia de BaCl<sub>2</sub>. Dichos voltajes se corrigieron según el LJP (Neher, 1992; Gómez y cols., 2009; Caballero y cols., 2010a). El LJP entre la pipeta y la solución externa fue de -11.3 mV para los registros de  $I_{K1}$ .

Para el registro de la  $I_{Na}$  en miocitos auriculares humanos, la solución externa contenía (en mM): NaCl 5, CsCl 132.5, CaCl<sub>2</sub> 1, MgCl<sub>2</sub> 1, CdCl<sub>2</sub> 0.1, HEPES 20, y glucosa 10 (ajustado a pH 7.4 con CsOH). Las micropipetas utilizadas para el registro se rellenaron con una solución interna cuya composición era (en mM): NaF 10, CsF 110, CsCl 20, HEPES 10, y EGTA 10 (ajustada a pH 7.35 con CsOH). El protocolo para registrar la  $I_{K1}$  auricular humana consistió en pulsos de 250 ms en incrementos de 10 mV (desde un potencial de fijación de -40 mV) a potenciales entre -100 mV y 0 mV. Las relaciones I-V se obtuvieron representando la amplitud de la corriente medida al final del pulso en función del voltaje aplicado, en intervalos de 10 mV. El protocolo para registrar la  $I_{Na}$  auricular humana consistió en pulsos de 50 ms en incrementos de 5 mV desde un potencial de fijación de -120 mV a potenciales entre -100 y -10 mV.

En todos los experimentos, la amplitud de la corriente se normalizó a la capacitancia de la membrana para obtener la densidad de corriente. Tanto los registros de la  $I_{K1}$  como la  $I_{Na}$  se realizaron a una frecuencia de muestreo de 4 y 50 kHz respectivamente, se filtraron a la mitad de la frecuencia de muestreo y se guardaron en el disco duro de un ordenador para su posterior análisis. Los datos se analizaron usando el software pCLAMP (Molecular Devices).

## 4. REGISTRO DE $I_{K1}$ E $I_{Na}$ EN MIOCITOS VENTRICULARES DE RATA ADULTA

### 4.1. Disociación enzimática de miocitos ventriculares de rata

El procedimiento mediante el cual se obtuvieron los corazones de rata está conforme con el *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* publicado por el Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH Publication No. 85-23, Revisado en 1996) y aprobado por el Comité de Uso y Cuidado de Animales de la Universidad Complutense de Madrid y de la Universidad de Michigan.

Los miocitos ventriculares se aislaron de corazones de cinco ratas macho adultas de la raza Sprague–Dawley (con pesos de entre 225 y 250 gramos) mediante disociación enzimática siguiendo un protocolo utilizado por el grupo del Dr. José Jalife (Milstein y cols., 2012) y que fue adaptado a partir de estudios anteriores (Haworth y cols., 1980; Westfall y cols., 1997; Caballero y cols., 2004). Las ratas fueron heparinizadas (1.000 U/kg i.p.) y anestesiadas con pentobarbital sódico (50 mg/kg i.p.). Cuando las ratas no respondían a estímulos, se les extirpó el corazón que se conectó rápidamente a un sistema de perfusión de Langendorff a través de una cánula insertada en la aorta. El corazón se perfundió inicialmente con una solución *Tyrode* 0  $Ca^{2+}$  (cuya composición era en mM: NaCl 112, KCl 10,  $MgCl_2$  1.2, HEPES 10, taurina 20, y glucosa 10; ajustado a pH 7.4 con NaOH) durante 10 minutos con un flujo constante de 8 mL/minuto. Luego, el corazón se perfundió durante otros 15 minutos con la misma solución suplementada con 0.35 mg/mL colagenasa tipo II (Worthington) y albúmina al 1%. Las soluciones perfundidas estaban continuamente oxigenadas (95%  $O_2$ /5%  $CO_2$ ) y con una temperatura fija de 37°C. Tras ello, los corazones se descolgaron del aparato de Langerdoff y los ventrículos se cortaron en pequeños trozos y se mantuvieron en agitación suave con una solución *Tyrode* suplementada con 1 mM  $CaCl_2$ , 33  $\mu$ M blebistatina y 2% de albúmina, para dispersar las células. Las células obtenidas se dejaron reposar durante 30 minutos y se resuspendieron en Medio 199 (M199, Sigma) suplementado con 5% de suero fetal bovino (Invitrogen, USA), 1.8 mM  $Ca^{2+}$  y 100 U/mL de penicilina y 100  $\mu$ g/mL de estreptomicina.

### 4.2. Cultivo e infección de miocitos ventriculares de rata

Debido a la baja eficiencia (10%) en la transfección de plásmidos en miocitos con agentes lipídicos tales como XtremeGENE HP o LipofectAMINE 2000, se decidió utilizar construcciones adenovirales/lentivirales para la expresión de las proteínas de interés. La utilización de estos vectores permiten obtener una eficiencia en la infección cercana al 90% (Kirshenbaum y cols., 1993; Marian y cols., 1995; Djurovic y cols., 2004; Louch y cols., 2011; Lang y cols., 2015).

## Material y Métodos

Los miocitos ventriculares de rata adulta se sembraron en cubre objetos estériles previamente tratados con laminina 0,04 mg/ml (Sigma) y se mantuvieron en medio M199 durante dos horas. Transcurrido este tiempo, se infectaron con las construcciones adenovirales que codificaban o bien para el extremo N-terminal (Nter, 132 aa) de la subunidad  $\alpha$  del canal de sodio humano cardíaco unido a GFP (*Green Fluorescent Protein*), virus denominado Ad-Nter, o bien para GFP únicamente (Ad-GFP). Ambas construcciones fueron amablemente proporcionadas por el grupo de investigación del Dr. José Jalife.

En un último grupo de experimentos en el que se llevó a cabo el silenciamiento de  $\alpha$ 1-sintrofina, se infectaron los miocitos ventriculares de rata con lentivirus que codificaban para dos *shRNAs* (Tabla IV.4) de  $\alpha$ 1-sintrofina (Acc. No. NM\_001100901.1) (Origene Technologies, Inc. USA) y que fueron empaquetados por la Unidad de Vectores Virales del CNIC (Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares). Como control de silenciamiento se utilizó un lentivirus que codificaba para un *shRNA scramble*, (Origene Technologies, Inc. USA). Todos los lentivirus codificaban además para GFP como control de infección. Los experimentos de *western blot* demostraron que la  $\alpha$ 1-sintrofina se silenciaba en una proporción mayor al 70% a las 48 horas de la infección. Por tanto, los experimentos de electrofisiología se llevaron a cabo 48 horas después de la infección.

| Proteína              | shRNA         | Secuencia sentido ( 5' - 3')  |
|-----------------------|---------------|-------------------------------|
| $\alpha$ 1-sintrofina | shRNA A SNTA1 | GAAGATGGCGTATGTCTCAAGGAGGTGTA |
|                       | shRNA B SNTA1 | CATCCACTCTTTCCTGTCTGCCAAGGTCA |

**Tabla IV.4. Secuencia de ADNc que codifica para los *shRNA* utilizados en el silenciamiento de  $\alpha$ 1-sintrofina en miocitos ventriculares de rata adulta.**

Para los miocitos ventriculares de rata adulta, la multiplicidad de infección (MOI) fue de 100, 75, 100, 30 y 80 para el Ad-Nter, el Ad-GFP, los Ad-Nav1.5, *shRNA* SNTA1 (A y B) y *shRNA scramble*, respectivamente. Se utilizó el mismo stock adenoviral/lentiviral en todos los experimentos para eliminar variables que afectaran a los resultados. Las corrientes se registraron 48 horas después de la infección. Los miocitos infectados con las construcciones virales se

identificaban mediante la visualización de la fluorescencia emitida por GFP (Figura IV.5) utilizando un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse TE2000S, Nikon).



**Figura IV.5. Miocitos ventriculares de rata cultivados en nuestro laboratorio e infectados con Ad-GFP 48h. (A)** Miocitos ventricular de rata visto en campo claro con objetivo x40. **(B)** Misma imagen que en A pero utilizando un filtro de FITC (*fluorescein-isothiocyanate*) para comprobar que la célula ha sido infectada con el Ad-GFP. **(C)** Miocitos ventriculares de rata infectados con Ad-GFP y observados con el objetivo x20.

#### 4.3. Técnicas de registro de la $I_{K1}$ e $I_{Na}$ ventriculares de rata

El registro de las corrientes nativas en miocitos ventriculares de rata se realizaba de manera similar a como se ha explicado en el apartado 2.4 para el registro de corrientes en sistemas de expresión heterólogos. Todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente. Las micropipetas empleadas en estos registros fueron obtenidas como se ha descrito en el apartado 2.4. Su resistencia, una vez rellenas con la solución interna y sumergidas en la solución externa, era de 2-4 M $\Omega$ . El cálculo de la capacitancia, la resistencia de acceso y la impedancia de entrada a la célula se realizó como se ha descrito previamente para los sistemas de expresión heterólogos. En los miocitos ventriculares de rata infectados con el Ad-GFP los valores de la resistencia de acceso y la capacitancia celular fueron  $2.0 \pm 0.8$  M $\Omega$  y  $83.6 \pm 4.2$  pF ( $n=36$ ), respectivamente, mientras que la amplitud media máxima (a -100 mV) de la  $I_{K1}$  y el pico de la amplitud máxima de  $I_{Na}$  fueron  $-1932 \pm 112$  y  $-1039 \pm 107$  pA, respectivamente.

Los voltajes se corrigieron según el LJP (Neher, 1992; Gómez y cols., 2009; Caballero y cols., 2010a). El LJP entre la pipeta y la solución externa fue de -12 mV para los registros de  $I_{K1}$  en miocitos ventriculares de rata.

Como se ha mencionado para sistemas de expresión heterólogos, para minimizar los cambios en las propiedades tiempo y voltaje dependientes de la corriente  $I_{Na}$ , los registros se realizaron después de 20 minutos de establecer la configuración de célula entera. En estas condiciones, la amplitud de

la corriente y la dependencia de voltaje de la activación e inactivación se mantenían estables durante el transcurso del experimento.

#### 4.4. Registro de la $I_{K1}$ e $I_{Na}$ ventriculares de rata: Soluciones y protocolos experimentales

Para el registro de la  $I_{K1}$  en miocitos ventriculares de rata, la solución externa contenía (en mM): NaCl 120, KCl 20,  $CaCl_2$  1,  $MgCl_2$  1, HEPES 10, 4-aminopiridina 2, glucosa 10, y glibenclamida (10  $\mu$ M) (ajustada a pH 7.4 con NaOH). A dicha solución se le añadía nifedipino (1  $\mu$ M) y atropina (1  $\mu$ M) para inhibir  $I_{Ca,L}$  e  $I_{K,ACh}$ , respectivamente. Las micropipetas utilizadas para el registro se rellenaron con una solución interna cuya composición era igual a la utilizada para miocitos auriculares humanos (en mM): K-aspartato 80, KCl 42,  $KH_2PO_4$  10, Mg-ATP 5, fosfocreatina 3, HEPES 5 y EGTA 5 (ajustada a pH 7.2 con KOH).

En algunos experimentos, y para confirmar que la corriente registrada era  $I_{K1}$  se perfundía con una solución externa a la que se añadía  $BaCl_2$  (100  $\mu$ M). En estas condiciones, se consideraba  $I_{K1}$  como la corriente sensible a  $BaCl_2$  y su amplitud a los diferentes voltajes estudiados se calculaba como la diferencia entre la corriente total, registrada con la solución externa carente de  $BaCl_2$ , y la corriente registrada en presencia de  $BaCl_2$ .

Para el registro de la  $I_{Na}$  en miocitos ventriculares de rata, la solución externa contenía (en mM): NaCl 5, CsCl 132.5,  $CaCl_2$  1,  $MgCl_2$  1,  $CdCl_2$  0.1, HEPES 20, y glucosa 10 (ajustado a pH 7.4 con CsOH). Las micropipetas utilizadas para el registro se rellenaron con una solución interna cuya composición era (en mM): NaF 10, CsF 110, CsCl 20, HEPES 10, y EGTA 10 (ajustada a pH 7.35 con CsOH).

El protocolo para registrar la  $I_{K1}$  ventricular de rata consistió en pulsos de 250 ms en incrementos de 10 mV (desde un potencial de fijación de -40 mV) a potenciales entre -100 y +40 mV. Las relaciones I-V se obtuvieron representando la amplitud de la corriente medida al final del pulso en función del voltaje aplicado, en intervalos de 10 mV.

El protocolo para registrar la  $I_{Na}$  ventricular de rata consistió en pulsos de 50 ms en incrementos de 5 mV (desde un potencial de fijación de -120 mV) a potenciales entre -100 y -10 mV.

En todos los experimentos, la amplitud de la corriente se normalizó a la capacitancia de la membrana para obtener la densidad de corriente.

La  $I_{K1}$  y la  $I_{Na}$  se registraron utilizando una frecuencia de muestreo de 4 y 50 kHz respectivamente, se filtraron a la mitad de la frecuencia de muestreo y se guardaron en el disco duro de un ordenador para su posterior análisis. Los datos se analizaron usando el software pCLAMP (Molecular Devices).

## 5. EXPERIMENTOS DE *WESTERN BLOT* Y CO-INMUNOPRECIPITACIÓN

### 5.1. Preparación del lisado crudo de aurícula humana y ventrículo de rata, ratón y cobayo

El procedimiento mediante el cual se obtuvieron los corazones de rata, ratón cobayo está conforme con las Guías de la Directiva 2010/63/EU del Parlamento Europeo para la protección de los animales utilizados con propósitos científicos y aprobado por el Comité de Uso y Cuidado de Animales de la Universidad Complutense de Madrid y de la Universidad de Michigan. Los animales fueron heparinizados (1.000 U/kg i.p.) y anestesiados con pentobarbital sódico (50 mg/kg i.p.). Cuando los animales no respondían a estímulos, se les extirpó el corazón, se cortaron los ventrículos de seis ratas macho adultas raza Sprague–Dawley, de tres cobayos macho adultos y de tres ratones macho adultos, se lavaron con PBS frío, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C hasta su extracción proteica.

El protocolo del que se obtuvieron las muestras de orejuelas auriculares humanas procedentes de pacientes en RS se ha descrito en el apartado 3.

Los ventrículos o aurículas se homogenizaron primero en un homogenizador manual tipo *Dounce* (10 golpes) y posteriormente en un triturador de tejido *UltraTurrax T-25* (ráfagas de 3x10 segundos) con el tampón *radioimmunoprecipitation assay* (tampón RIPA) frío, cuya composición era 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS, 0.5% desoxicolato y una mezcla de inhibidores de proteasas P2714 (Sigma). Para preservar mejor las interacciones entre proteínas, el tampón RIPA se suplementó con un agente *crosslinker*, el 3,3-ditiobispropionimidato (DTBP) (Wang y cols., 1974) (Thermo Scientific Pierce, USA) recién preparado (0.5 mg/ml) y utilizado anteriormente en nuestro laboratorio (Delpón y cols., 2008).

Los núcleos y restos celulares se eliminaron mediante centrifugación a 14,000 rpm durante 20 minutos a 4°C y el sobrenadante se utilizó inmediatamente para evitar ciclos de congelación/descongelación y posible degradación proteica.

### 5.2. Extracción proteica de células CHO transfectadas

Las células CHO se transfectaron utilizando los procedimientos descritos en el apartado 2.2. Tras 24 horas (para los estudios de silenciamiento) o 48 (para los experimentos de co-

inmunoprecipitación), las células se lavaron con PBS frío (3x) y se lisaron incubándolas con tampón RIPA (ver composición en el apartado 5.1) durante 30 minutos a 4°C para dejar actuar el tampón. Los núcleos y restos celulares se eliminaron mediante centrifugación a 14,000 rpm durante 20 minutos a 4°C y el sobrenadante se utilizó inmediatamente para evitar ciclos de congelación/descongelación y posible degradación proteica.

### **5.3. Cuantificación de proteínas**

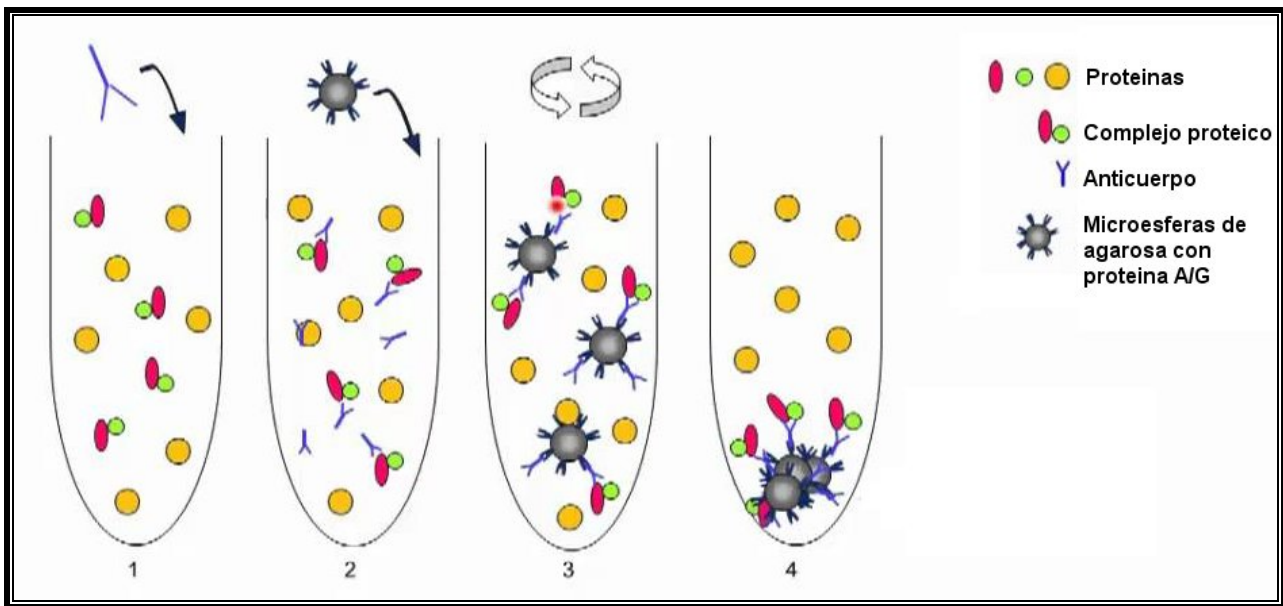
Para cuantificar la proteína, se utilizó el método BCA (Thermo Scientific, Pierce) siguiendo las instrucciones del proveedor. El ácido bicinconínico (BCA), es un compuesto capaz de formar un complejo púrpura intenso con iones  $\text{Cu}^{1+}$  en medio alcalino. Este reactivo forma la base de un método analítico capaz de monitorizar el ión cuproso producido en una reacción entre las proteínas con  $\text{Cu}^{2+}$  en medio alcalino (reacción de Biuret).

Básicamente consistió en preparar distintas diluciones de las muestras junto con los reactivos A y B del kit, y, tras 30 minutos a 37°C, leer la absorbancia a 562 nm. Con los datos obtenidos se construyó una curva patrón con las distintas concentraciones conocidas de BSA frente a los valores obtenidos de la absorbancia, que permitió cuantificar la cantidad de proteína presente en las muestras objeto de estudio mediante extrapolación.

### **5.4. Co-inmunoprecipitación (Co-IP)**

La co-inmunoprecipitación o Co-IP es un método utilizado para detectar interacciones proteína-proteína gracias a la utilización de un anticuerpo específico asociado a microesferas de agarosa que se unen a una de las proteínas del complejo con la finalidad de aislarlo mediante centrifugaciones sucesivas para posteriormente detectar mediante *western blot* las demás moléculas que forman el complejo (Figura IV.6). Todas las Co-IPs de la presente Tesis Doctoral se realizaron esencialmente adaptando protocolos anteriormente descritos (Delpón y cols., 2008; Milstein y cols., 2012) utilizando Proteína A/G Plus Agarosa (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA) que consiste en una mezcla de proteína A y G recombinante unida a microesferas de agarosa.

Primero, para eliminar las posibles interacciones inespecíficas entre nuestra muestra y las microesferas, se puso en contacto al extracto proteico soluble (obtención descrita en el apartado 5.1 y 5.2) con las microesferas de agarosa (proceso conocido como preclareado), y se incubó la mezcla



**Figura IV.6. Co-inmunoprecipitación o Co-IP.** (1) Se añade el anticuerpo específico al lisado proteico. (2) Se añade las microesferas de agarosa con proteína A/G. (3) Se hacen varias centrifugaciones sucesivas. (4) El complejo proteico queda en el pellet y se puede recuperar para su posterior análisis por *western blot*.

durante 30 minutos a 4°C para, posteriormente, centrifugarla a 2500 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante obtenido en el preclareado se incubó con el anticuerpo primario (2 a 5 ug, según proteína) durante 3 horas a 4°C, tras lo cual se añadieron 20 µL de microesferas, incubando a 4°C en rotación durante toda la noche. Como control negativo, el extracto soluble se mezcló con suero del animal de donde procedían los anticuerpos. Los complejos proteína-anticuerpo-microesferas se centrifugaron a 10,000 rpm durante 2 minutos y los precipitados se lavaron suavemente 4 veces con tampón RIPA frío (agitando por inversión) para eliminar interacciones inespecíficas. Tras la última centrifugación, se eliminó totalmente el sobrenadante y se añadieron 40 µL de tampón de carga (Bio-Rad, USA) con 2β-mercaptoetanol para, a continuación, disociar los inmunocomplejos mediante agitación y calentamiento de la muestra a 95°C durante 5 minutos (excepto en el caso de Nav1.5, donde se calentó la muestra a 37°C durante 30 minutos, debido a que a 95°C se producía la degradación de Nav1.5) (Malhotra y cols., 2000). Finalmente, se centrifugó 5 minutos a 3000 rpm para recoger con sumo cuidado los sobrenadantes (evitando recoger las esferas) para cargar y separar las proteínas en un gel de poliacrilamida.

Cada grupo de experimentos de Co-IP, se analizaron, en al menos, el tejido de cuatro ventrículos de rata, tres de cobayo y tres de ratón distintos y en al menos cuatro lotes de células distintos.

### **5.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida, transferencia de proteínas a membrana e inmunodetección**

Las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida del 6 al 10% (dependiendo del peso molecular de la proteína a visualizar) y se sometieron a electroforesis SDS-PAGE (Laemmli, 1970) a voltaje constante [90 V y 120 V para los geles hechos a mano y a 200-300 V para los geles comerciales TGX *stain free*<sup>TM</sup> (Bio-Rad, USA)]. Una vez finalizada la electroforesis, se llevó a cabo la transferencia húmeda durante 70 minutos con amperaje constante (200 mA) o bien la transferencia rápida (Bio-Rad, USA) durante 15 minutos a 25 V del gel a una membrana de nitrocelulosa.

A continuación, para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos primarios a la membrana, ésta se bloqueó durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación con PBS suplementado con Tween al 0,05% (PBS-T) y leche desnatada liofilizada al 5% para, seguidamente, incubar con el anticuerpo primario (diluido en tampón de bloqueo con leche desnatada al 5%) a 4°C y agitación constante durante toda la noche. Tras lavar la membrana 3 veces x 7 minutos con tampón PBS-T, se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) (1:10000, Jackson ImmunoResearch, USA) para la detección de las proteínas en los lisados o bien con el complejo proteína A-HRP (1:10000, Life Technologies) para la detección de las proteínas inmunoprecipitadas durante una hora a temperatura ambiente.

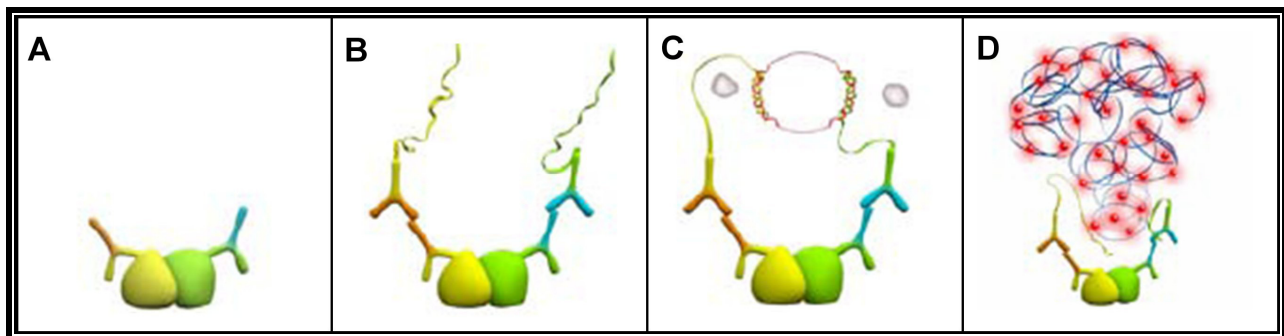
En algunos casos, los anticuerpos secundarios utilizados para detectar las proteínas transferidas a membrana pueden unirse tanto a las inmunoglobulinas (Igs) del anticuerpo primario utilizado en la inmunodetección como a las Igs residuales del anticuerpo primario utilizado en la Co-IP. La proteína A-HRP (Lal y cols., 2005), se une específicamente a las Igs pertenecientes a los anticuerpos primarios utilizados para la inmunodetección (que no han sido sometidas a desnaturalización), pero no a las Igs residuales de la Co-IP (que sí han sido desnaturalizadas mediante SDS y calor); de este modo, se evita que el marcaje correspondiente a las Igs residuales de la Co-IP interfiera con el de las proteínas de interés. Debe tenerse en cuenta que el peso molecular de la cadena pesada de las Igs es aproximadamente de 50 KDa y que proteínas como los canales Kir2.x o la sintrofina tienen un peso estimado de entre 45 y 55 KDa. Por este motivo, en los experimentos de Co-IP en los que se detectan proteínas con estos pesos, es fundamental el uso de la proteína A-HRP, para facilitar la detección de las proteínas de interés de una forma fiable.

Finalizada la incubación de 1 hora con el anticuerpo secundario, se realizaron tres lavados de 5 minutos en PBS-T 0,05% para, a continuación, detectar las proteínas mediante quimioluminiscencia potenciada (ECL, General Electric Healthcare, USA). Se utilizó un equipo de imagen Chemidoc MP System y el software Image Lab 5.2.1 (Bio-Rad, USA) para el análisis densitométrico de las imágenes. Para asegurar la carga equitativa de proteína en los *western blot* de silenciamiento de SAP97 y  $\alpha 1$ -sintrofina en células CHO, se determinó la expresión de GAPDH. Por otro lado, para el análisis del silenciamiento de  $\alpha 1$ -sintrofina en miocitos ventriculares de rata, se utilizaron geles TGX *stain free*<sup>TM</sup> (Bio-Rad, USA) con el fin de utilizar la cantidad de proteína total de cada carril como control de carga (Rivero-Gutiérrez y cols., 2014).

## 6. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

### 6.1. Ensayo de ligación por proximidad en la membrana de miocitos ventriculares de rata

El ensayo de ligación por proximidad, PLA (*Proximity Ligation Assay*) o también denominado por su fabricante Duolink<sup>®</sup> (Olink Bioscience, Uppsala, Suecia) permite la detección *in situ* de proteínas que están situadas a una distancia menor a 40 nm entre sí (Fredriksson y cols., 2002;



**Figura IV.7. Ensayo de ligación por proximidad, PLA o Duolink.** (A) Los anticuerpos primarios de diferente especie (azul o naranja) reconocen las proteínas que supuestamente forman el complejo (en amarillo y verde). (B) Se añaden las sondas PLA que son anticuerpos secundarios especiales unidos a una hebra sencilla de ADN, que se unen a los anticuerpos primarios. (C) Las hebras de ADN de las sondas PLA se unen mediante una incubación con ligasa. (D) Se amplifica el ADN mediante círculo rodante con oligonucleótidos marcados con fluorescencia. [Adaptada de Gullberg y cols., 2010]

Söderberg y cols., 2006; Gullberg y cols., 2010). Los experimentos de Duolink fueron llevados a cabo en la membrana celular de miocitos ventriculares de rata usando como base el protocolo utilizado en el laboratorio del Dr. Hugues Abriel (Universidad de Berna, Berna, Suiza) (Shy y cols., 2014), pero adaptado en nuestro caso para no permeabilizar la membrana celular y poder observar

la posible interacción proteína-proteína únicamente en la superficie (no se empleó ningún detergente (NDS) que pudiera disgregar la membrana).

Una vez disociados los miocitos según el protocolo descrito en el apartado 4.1, se fijaron en PBS al 4% de PFA durante 15 minutos a 4°C, y seguidamente se bloquearon en PBS con suero de burro (Abcam, Reino Unido) al 10% y BSA al 1% durante 30 minutos a temperatura ambiente. La incubación con los anticuerpos primarios (concentraciones en apartado 7.1) se hizo en PBS con suero de cabra al 3% y BSA al 1% a 4°C durante toda la noche (Figura IV.7.A). Las siguientes incubaciones se hicieron a 37°C utilizando los tampones de lavado apropiados después de cada incubación (según protocolo del fabricante). Después de lavar tres veces en PBS durante 5 minutos para eliminar el exceso de anticuerpo primario, se añadieron a las muestras los anticuerpos secundarios Duolink® (sondas PLA) y se incubaron durante una hora (Figura IV.7.B). Estas sondas PLA consistían en anticuerpos secundarios unidos a aptámeros de ADN (hebras sencillas de ADN que son capaces de adoptar estructuras globulares lo que les permite exhibir unas complejas y sofisticadas propiedades de reconocimiento molecular siendo capaces de unirse de una manera estable y muy específica a sus dianas. Dichas dianas moleculares pueden ser pequeñas moléculas como ATP, proteínas, ácidos nucleicos y complejas estructuras multiméricas) (Fredriksson y cols., 2002), los cuales tienen secuencias complementarias, pudiendo unirse entre sí formando un cebador circular después de la adición de la solución de ligación (que contiene ligasa) e incubación durante 30 minutos (Figura IV.7.C). Después, la amplificación mediante círculo rodante de este cebador circular fue llevada a cabo añadiendo solución de amplificación, conteniendo polimerasa y oligonucleótidos marcados con fluorescencia, lo cuales, hibridan con el molde circular durante 100 minutos de incubación (Figura IV.7.D). Las muestras fueron posteriormente montadas con medio de montaje *in situ* con DAPI de Duolink y observadas al microscopio.

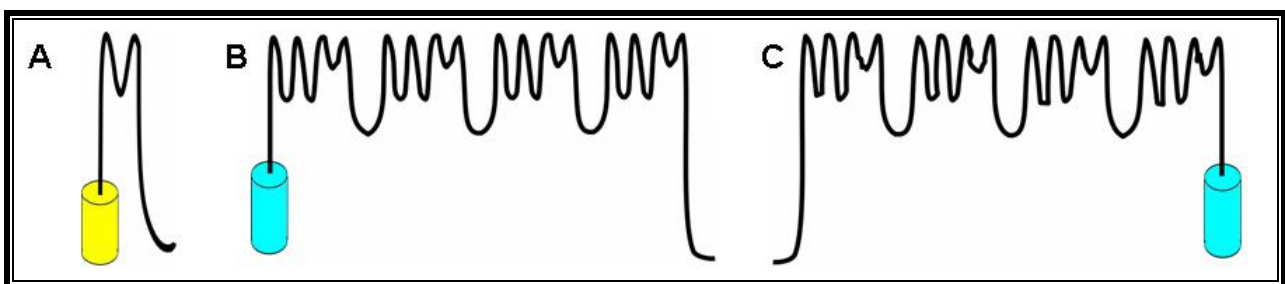
Las preparaciones se analizaron mediante microscopía confocal, con el microscopio Leica TCS-SP5 AOBS (Mannheim, Germany) a través de objetivos de inmersión de 40 y 63 aumentos, empleando un filtro para rodamina (TRITC) para visualizar la sonda fluorescente unida a los oligonucleótidos suministrados en el kit de Duolink ( $\lambda_{ex} = 554 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{em} = 579 \text{ nm}$ ). Las líneas láser provienen de un láser de estado sólido bombeado por diodos (DPSSL, *diode-pumped solid-state laser*) a 561 nm. Para verificar la especificidad de la reacción del Duolink se realizaron controles en ausencia de anticuerpos primarios. El tratamiento y análisis de las imágenes se realizó mediante el programa informático Image J, asignando el color verde a la imagen tomada con filtro TRITC.

## 6.2. Determinación de la expresión de Kir2.1 en la membrana de células HEK293

Para confirmar que la cotransfección de estos dos canales conllevaba un aumento de su expresión en la membrana celular respecto a la expresión en membrana al transfectar cada canal individualmente, se decidió construir varias quimeras de los canales unidas a proteínas fluorescentes y así poder analizar los resultados mediante microscopía confocal.

### 6.2.1. Construcción de quimeras

El canal Kir2.1 se subclonó entre los sitios de corte de las enzimas de restricción EcoRI y XhoI del vector pcDNA3.1(+), para posteriormente subclonar cp173Venus, una proteína fluorescente amarilla (YFP) mejorada y modificada por permutación circular en el aminoácido 173 (Rekas y cols., 2002; Nagai y cols., 2004), entre los sitios NheI y AflII del mismo plásmido, y así obtener la quimera cp173Venus-Kir2.1. La secuencia que conectaba el fluoróforo cp173Venus y la proteína Kir2.1, de 93 pares de bases, era YPLSLVPSSDPQSSVVEFDSKAEALESPAEA. En este caso la proteína fluorescente fue insertada antes del extremo N-terminal de Kir2.1, Figura IV.8.A. Por otro lado el canal Nav1.5 se subclonó en el sitio de restricción HindIII de pcDNA3.1(+) y posteriormente se insertó mTq2 (*monomeric Turquoise 2*) (Goedhart y cols., 2012), una variante más brillante de la proteína fluorescente cian (CFP) entre los sitios NheI y AflII o entre NotI y XbaI en el mismo plásmido obteniendo, por un lado, la quimera mTq2-Nav1.5 (proteína fluorescente insertada antes del extremo N-terminal de Nav1.5, Figura IV.8.B) y por otro, Nav1.5-mTq2



**Figura IV.8. Quimeras canal-proteína fluorescente.** (A) cp173Venus-Kir2.1 (cp173Venus, en amarillo, insertado antes del extremo N-terminal de Kir2.1). (B) mTq2-Nav1.5 (mTq2, en cian, insertado antes del extremo N-terminal de Nav1.5). (C) Nav1.5-mTq2 (mTq2, en cian, insertado después del extremo C-terminal de Nav1.5)

(proteína fluorescente insertada después del extremo C-terminal de Nav1.5, Figura IV.8.C). La secuencia que conectaba el fluoróforo mTq2 y el extremo N-terminal de la proteína Nav1.5, de 18 pares de bases, era YLKLT; mientras que la secuencia conectora entre el extremo C-terminal de la

proteína Nav1.5 y el fluoróforo mTq2 era WKAWYRARIHASSVVEFCRYPAQWRPLET. Todas las construcciones fueron confirmadas por secuenciación. Es importante destacar que la expresión de los tres canales en células CHO daba lugar a corrientes iónicas con idénticas características que las generadas por los canales sin las sondas fluorescentes.

### **6.2.2. Cultivo, transfección y fijación de células HEK293**

Tanto el cultivo, transfección, fijación y posterior análisis mediante microscopía confocal fueron llevados a cabo en el laboratorio del Dr. Francisco Javier Díez Guerra (CBMSO, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Cantoblanco, UAM). Las células embrionarias de riñón humano 293 (HEK293) se cultivaron en placas de 60 mm de diámetro con medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) complementado con suero fetal bovino al 10% y una mezcla de antibióticos (100 U/mL de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina). Esta línea celular se mantuvo a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y se pasaron cada 4-5 días mediante un breve tratamiento con tripsina (0.5 mg/ml) (Caballero y cols., 2010a; Amorós y cols., 2013; Gómez y cols., 2014).

Para el estudio mediante microscopía confocal de la expresión de los canales Kir2.1 y Nav1.5 en la membrana plasmática, las células HEK293 se transfectaron de forma transitoria con el vector de expresión que contenía el gen de cp173Venus-Kir2.1 (1.6 µg) solo o junto con el canal Nav1.5-mTq2 o mTq2-Nav1.5 (1.6 µg) (ver apartado 6.3.1). Para realizar la transfección se utilizó el método del XtremeGENE HP (Roche Diagnostics, Barcelona, España), procedimiento que ha sido descrito en detalle en el apartado 2.2. Pasadas 24 horas después de la transfección, las células se levantaron mediante un leve tratamiento con tripsina (0.5 mg/ml) y se sembraron entre 100,000 - 250,000 células en cada cubreobjetos previamente tratados con poli-lisina (0.01 mg/ml). En estas condiciones, se incubaron las células a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% otras 24 horas más antes de llevar a cabo la fijación. La fijación de las células se llevó a cabo 48 horas después de la transfección con PFA al 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente (Broussard y cols., 2013). Una vez fijadas las células se lavaron los cubreobjetos 3 veces con PBS y se montaron sobre portaobjetos utilizando medio de montaje ProLong Gold Antifade (Invitrogen, USA). Las muestras se guardaron a 4°C en oscuridad para su posterior análisis mediante microscopía confocal.

### 6.2.3. Microscopía confocal y análisis de imagen

Las preparaciones se analizaron mediante microscopía confocal, con un microscopio de barrido láser confocal y multifotón LSM710 (Zeiss, Alemania) a través de objetivos de inmersión de 40 y 63 aumentos, empleando un filtro para mTq2 (CFP) ( $\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 454\text{-}568 \text{ nm}$ ) y otro filtro para cp173Venus (YFP) ( $\lambda_{\text{ex}} = 514 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 516\text{-}621 \text{ nm}$ ). Las líneas láser fueron proporcionadas mediante un diodo a 405 nm y mediante una lámpara de argón a 514nm para mTq2 y cp173Venus, respectivamente. El tratamiento y análisis de las imágenes se realizó mediante el programa informático Image J, asignando el color cian a mTq2-Nav1.5 y Nav1.5-mTq2, y el amarillo a cp173Venus-Kir2.1.

## 7. ANTICUERPOS

En el análisis de la expresión  $\alpha 1$ -sintrofina y SAP97 por *western blot* se utilizó la GAPDH como control de carga y para ello se determinó la expresión de la GAPDH usando el anticuerpo anti-GAPDH de ratón (1:100000, Sigma). Los anticuerpos anti-Nav1.5 de conejo (1:1000, Alomone, Israel), anti- $\alpha 1$ -sintrofina de conejo (1:5000, Sigma), anti-SAP97 de ratón (1:500, Abcam), anti- $\alpha 1$ -sintrofina de ratón (1:2000, Sigma), anti-Kir2.1 de ratón (1:2000, Neuromab, USA), anti-Kir2.2 de ratón (1:1000, Abcam, Reino Unido) y anti-Kir2.3 de conejo (1:1000, Alomone) se usaron como anticuerpos primarios tanto para la detección específica de la expresión proteica como para los experimentos de Co-IP. La proteína A-HRP (1:10000, Life Technologies), el anticuerpo Anti-IgG de ratón unido a HRP (1:10000, Jackson ImmunoResearch), y el anticuerpo Anti-IgG de conejo unido a HRP (1:10000, Jackson ImmunoResearch) se usaron como anticuerpos secundarios.

Para los ensayos de ligación por proximidad (Duolink<sup>®</sup>), se utilizaron anticuerpos que permitieron reconocer epítopos de Nav1.5 (1:50, Abcam) y Kir2.1 (1:100, Abcam), localizados extracelularmente, debiendo estar producidos en especies distintas para llevar a cabo correctamente los experimentos [anti-Nav1.5 (ratón) y anti-Kir2.1 (conejo)].

## 8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

En cada serie homogénea de experimentos se calculó la media, la desviación estándar (DE) y el error estándar de la media (EEM). Los datos que aparecen en las distintas tablas y representaciones

gráficas de esta Tesis Doctoral se expresan como la media $\pm$ EEM para un determinado número (n) de experimentos. Para las comparaciones entre diferentes grupos, la prueba *t* de Student no pareada o el análisis de la varianza (ANOVA) de una vía, seguido de un test de Newman-Keuls. En muestras de pequeño tamaño ( $n < 15$ ), la significancia estadística fue confirmada utilizando tests no paramétricos. Las comparaciones entre variables categóricas fueron hechas usando la prueba Z. Para tener en cuenta la evaluación de muestras repetidas, los datos fueron analizados con modelos multinivel de efectos mixtos. Se consideraron como significativas aquellas diferencias para las que el valor de *P* resultó ser menor de 0.05.

Para la realización del análisis estadístico y la composición de las figuras que ilustran esta Tesis Doctoral se emplearon la aplicación CLAMPFIT del paquete informático PCLAMP (v9.0) (Molecular Devices), las aplicaciones Excel y PowerPoint del paquete informático Microsoft Office 2000 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EEUU) y el programa Prism (v3.0 y v4.0) (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EEUU).

## **V. Resultados**

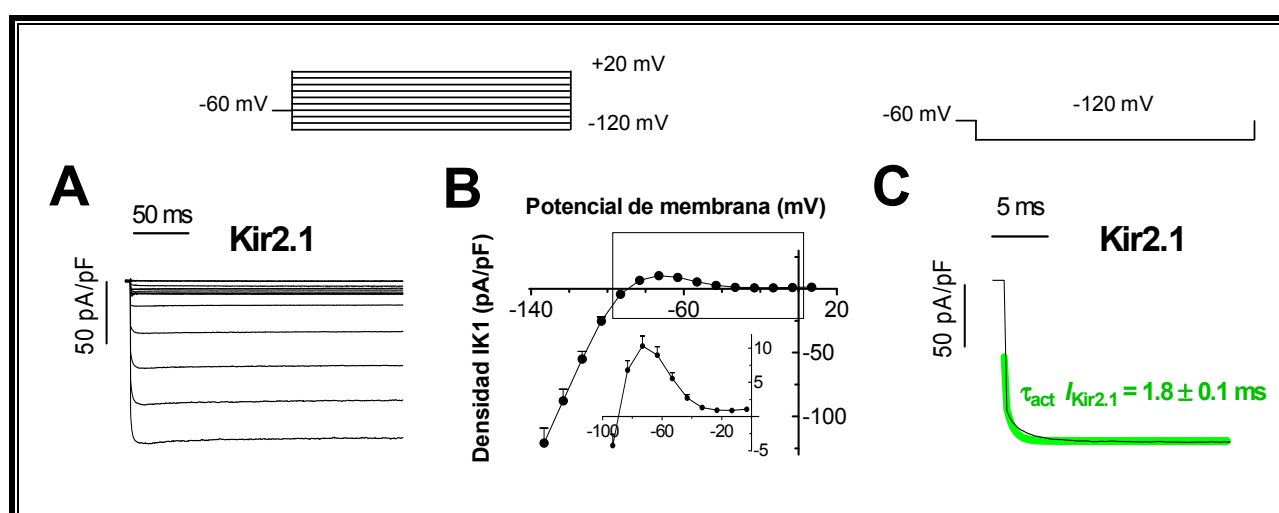


## 1. EFECTOS DE LA EXPRESIÓN DE Nav1.5- $\beta$ SOBRE LOS CANALES Kir2.x

### 1.1. Efectos de la expresión de Nav1.5- $\beta$ sobre la corriente $I_{Kir2.x}$

#### 1.1.1. Características electrofisiológicas de la $I_{Kir2.1}$

En la Figura V.1A se muestra una familia de trazos de corriente obtenidos en una célula CHO transfectada de forma transitoria con el ADNc que codifica la expresión del canal Kir2.1 (1.6  $\mu$ g). Los trazos de  $I_{Kir2.1}$  fueron registrados mediante la técnica de *patch-clamp* al aplicar pulsos de 250 ms de duración desde -120 mV hasta +20 mV en incrementos de 10 mV (potencial de fijación = -60 mV). Tras la aplicación del pulso, la  $I_{Kir2.1}$  alcanzaba rápidamente un pico máximo, y a continuación disminuía ligeramente a medida que se aplicaba el pulso hasta alcanzar la amplitud un nivel estable (Figura V.1C). El ajuste de una ecuación monoexponencial al trazo de corriente, desde la mitad de la amplitud máxima hasta el pico de la misma, permitía obtener la constante de tiempo de activación ( $\tau_{act} = 1.8 \pm 0.1$  ms a -120 mV;  $n = 12$ ) (Figura V.1C). Todos los valores de amplitud de corriente (pA) se normalizaron dividiendo entre el valor de la capacitancia (pF) de cada célula para obtener la densidad de corriente. En la Figura V.1B se muestra la relación densidad de corriente-voltaje característica de los canales Kir2.1 obtenida al representar la densidad de la corriente medida al final del pulso de 250 ms de duración en función del voltaje aplicado. Como se puede



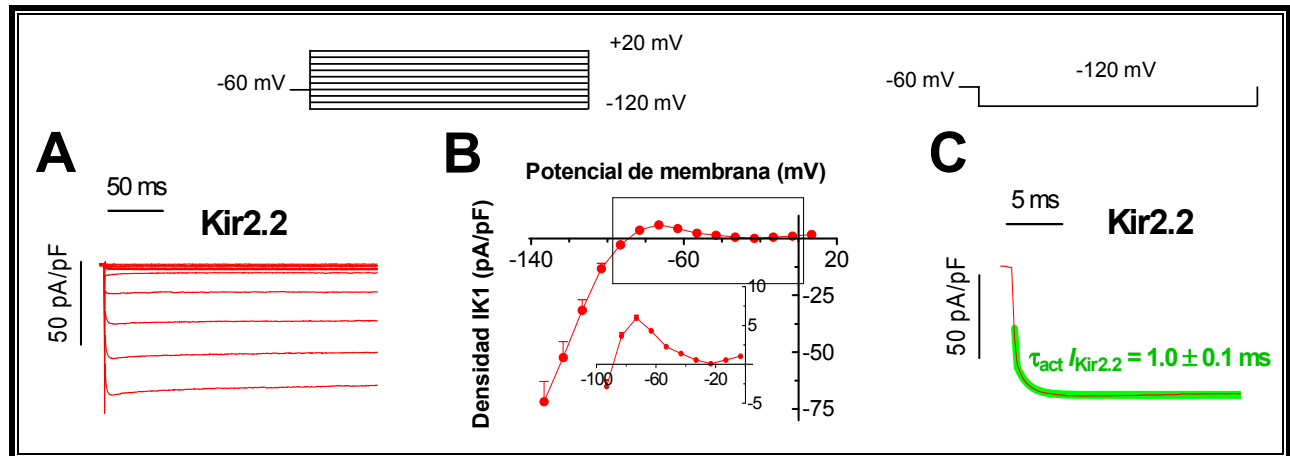
**Figura V.1. Características electrofisiológicas de  $I_{Kir2.1}$ .** (A) Familia de trazos representativa de  $I_{Kir2.1}$  registrados tras aplicar el protocolo que se muestra en la parte superior. (B) Relación densidad-voltaje medias construidas para la  $I_{Kir2.1}$  en células CHO con el rango de potenciales fisiológicamente relevante en el que se produce la salida de  $K^+$  y la rectificación interna ampliado en la parte inferior de la figura. Los potenciales de membrana se han corregido de acuerdo a un LJP de -13.2 mV. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de 31 experimentos/células. (C) Trazo de  $I_{Kir2.1}$  registrado a -120 mV en el que se superpone el ajuste monoexponencial de la cinética de activación (trazo verde).

## Resultados

observar, a potenciales más negativos que el potencial de inversión ( $E_K$ ), se genera una corriente de entrada de  $K^+$  cuya densidad disminuye a medida que el potencial de membrana ( $E_m$ ) se acerca al  $E_K$ . Por el contrario, a potenciales más positivos que el  $E_K$ , la corriente de  $K^+$  generada es de salida y su densidad disminuye hasta anularse conforme el potencial se va haciendo más positivo debido al fenómeno de rectificación interna que da nombre a estos canales (Figura V.1B, parte inferior), que implica la inhibición dependiente de voltaje de la misma por iones  $Mg^{2+}$  y diversas poliaminas intracelulares (putrescina, espermina, espermidina).

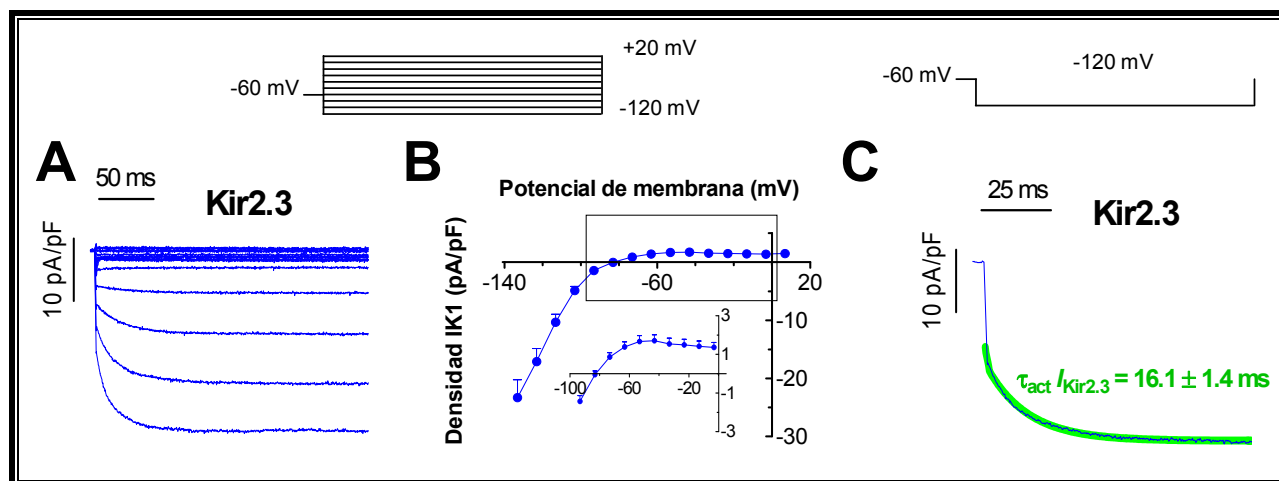
### 1.1.2. Características electrofisiológicas de la $I_{Kir2.2}$ e $I_{Kir2.3}$

Como se ha mencionado en la Introducción, si bien no se sabe a ciencia cierta cuál es la composición exacta de los canales que generan la  $I_{K1}$  humana, sí está ampliamente aceptado que los canales Kir2.1 son los principales responsables de dicha corriente a nivel ventricular, mientras que los canales Kir2.2 y en particular los Kir2.3 juegan un papel fundamental a la hora de generar la corriente a nivel auricular (Wang y cols., 1998; Lopatin y Nichols, 2001; Gaborit y cols., 2007; Anumonwo y Lopatin, 2010; Caballero y cols., 2010a). Las Figuras V.2A y V.3A muestran



**Figura V.2. Características electrofisiológicas de  $I_{Kir2.2}$ .** (A) Familia de trazos representativa de  $I_{Kir2.2}$  registrados tras aplicar el protocolo que se muestra en la parte superior. (B) Relación densidad de corriente-voltaje media construida para la  $I_{Kir2.2}$  en células CHO con el rango de potenciales fisiológicamente relevante en el que se produce la salida de  $K^+$  y la rectificación interna ampliado en la parte inferior de la figura. Los potenciales de membrana se han corregido de acuerdo a un LJP de  $-13.2$  mV. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de 27 experimentos/células. (C) Trazo de  $I_{Kir2.2}$  registrado a  $-120$  mV en el que se superpone el ajuste monoexponencial de la cinética de activación (trazo verde).

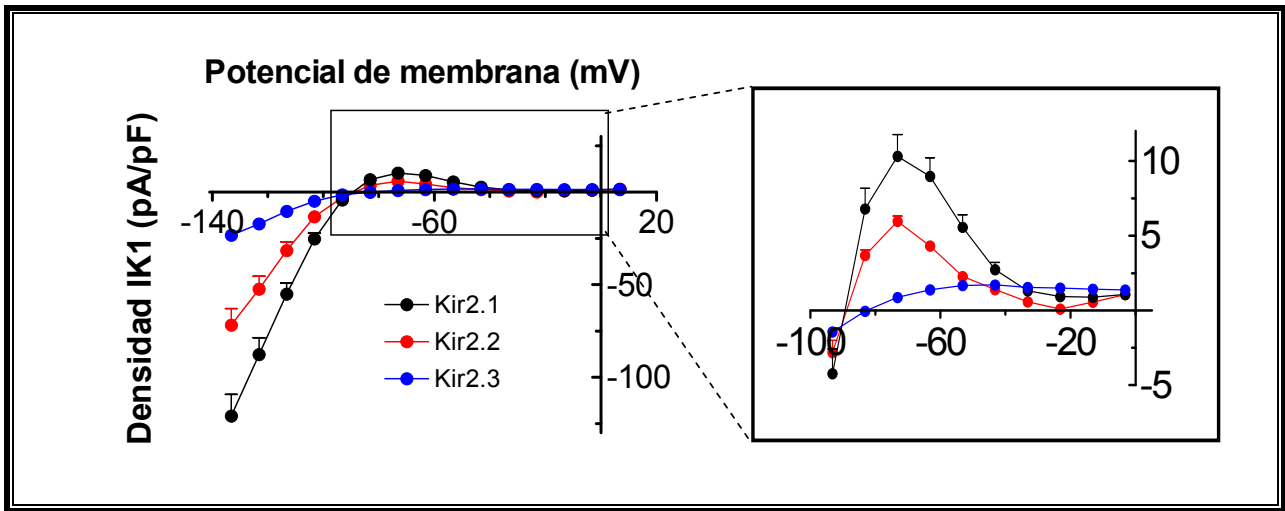
familias de trazos de  $I_{Kir2.2}$  (en rojo) e  $I_{Kir2.3}$  (en azul) obtenidas en células CHO transfectadas de forma transitoria con los plásmidos que codifican la expresión de los canales Kir2.2 (1.6  $\mu$ g) o



**Figura V.3. Características electrofisiológicas de  $I_{Kir2.3}$ .** (A) Familia de trazos representativa de  $I_{Kir2.3}$  registrados tras aplicar el protocolo que se muestra en la parte superior. (B) Relación densidad de corriente-voltaje media construida para la  $I_{Kir2.3}$  en células CHO con el rango de potenciales fisiológicamente relevante en el que se produce la salida de  $K^+$  y la rectificación interna ampliado en la parte inferior de la figura. Los potenciales de membrana se han corregido de acuerdo a un LJP de  $-13.2$  mV. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de 25 experimentos/células. (C) Trazo de  $I_{Kir2.3}$  registrado a  $-120$  mV en el que se superpone el ajuste monoexponencial de la cinética de activación (trazo verde).

Kir2.3 ( $1.6 \mu\text{g}$ ), respectivamente. Las corrientes fueron registradas al aplicar pulsos de 250 ms de duración desde  $-120$  hasta  $+20$  mV en incrementos de 10 mV (potencial de fijación =  $-60$  mV). En las Figuras V.2B y V.3B se muestran las relaciones densidad de corriente-voltaje características de los canales Kir2.2 y Kir2.3, respectivamente. Tanto para  $I_{Kir2.2}$  como para  $I_{Kir2.3}$ , el ajuste de una función monoexponencial al trazo a  $-120$  mV permitió obtener las correspondientes constantes de tiempo de activación ( $\tau_{act \text{ Kir2.2}} = 1.0 \pm 0.1$  ms a  $-120$  mV,  $n = 18$ ;  $\tau_{act \text{ Kir2.3}} = 16.1 \pm 1.4$  ms a  $-120$  mV,  $n = 5$ ) (Figuras V.2C y 3C, respectivamente). Como se puede observar, la  $I_{Kir2.3}$  presentaba una cinética de activación significativamente más lenta que las otras dos corrientes, tal y como se había descrito previamente (Panama y Lopatin 2006; Panama y cols., 2007). Como se ha comentado en la introducción, la fase de activación de las corrientes generadas por los canales Kir2.x no está determinada por las transiciones entre los estados conformacionales del canal sino que son consecuencia de la velocidad de disociación de las poliaminas de su sitio de unión en dichos canales.

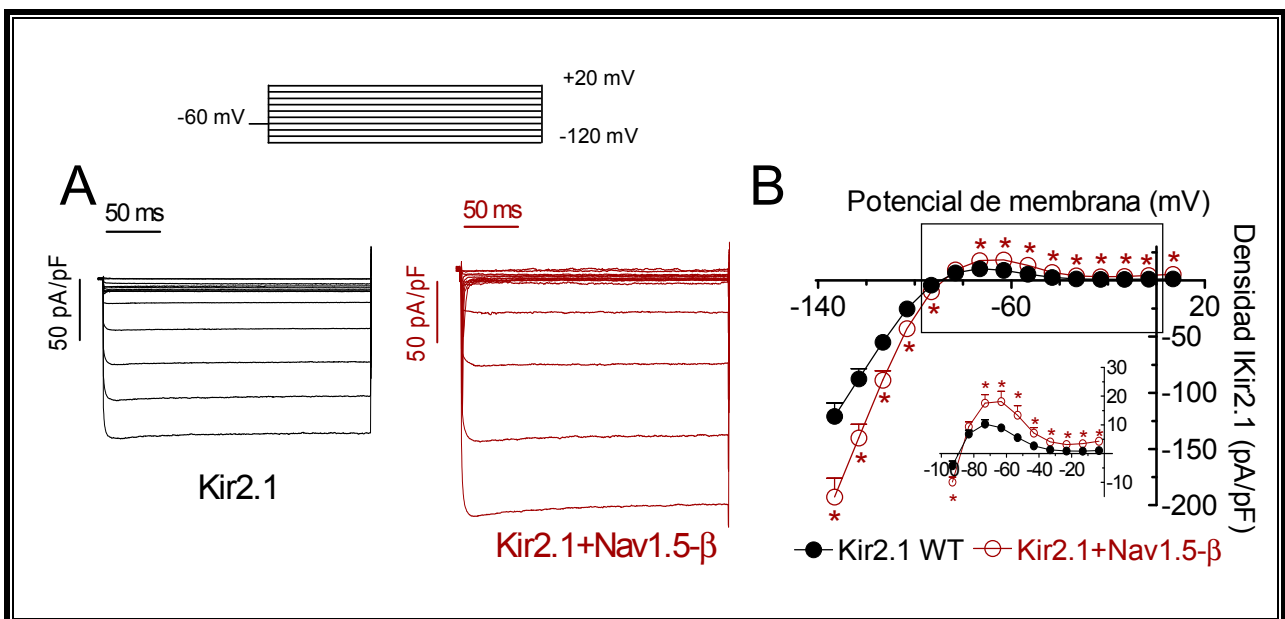
Superponiendo las relaciones densidad de corriente-voltaje para  $I_{Kir2.1}$ ,  $I_{Kir2.2}$  e  $I_{Kir2.3}$  registradas durante la realización de la presente Tesis Doctoral, se pueden observar las principales diferencias en sus características electrofisiológicas (Figura V.4). De las tres corrientes, la  $I_{Kir2.3}$  es la que presenta una menor densidad de corriente (debido principalmente a la menor conductancia de los canales Kir2.3 en parte como consecuencia de una menor afinidad por el PIP2 frente a Kir2.1 y Kir2.2) y una rectificación más débil (por una menor afinidad de las poliaminas por el poro del canal).



**Figura V.4. Relaciones densidad de corriente-voltaje de  $I_{Kir2.1}$ ,  $I_{Kir2.2}$  e  $I_{Kir2.3}$ .** Relaciones densidad de corriente-voltaje medias construidas para  $I_{Kir2.1}$ ,  $I_{Kir2.2}$  e  $I_{Kir2.3}$  en células CHO con el rango de potenciales fisiológicamente relevante en el que se produce la salida de  $K^+$  y la rectificación interna ampliado en el recuadro de la derecha. Los potenciales de membrana se han corregido de acuerdo a un LJP de -13.2 mV. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de más de 25 experimentos/células.

### 1.1.3. Efectos de la expresión de canales Nav1.5- $\beta$ sobre la $I_{Kir2.1}$

En la Figura V.5A se muestra una familia de trazos de corriente generada por homotetrámeros de los canales Kir2.1 ( $I_{Kir2.1}$ ) registrados en células CHO transfectadas transitoriamente con el ADNc de los canales Kir2.1 humanos (1.6  $\mu$ g) solos o junto con los ADNc que codifican para las subunidades  $\alpha$  del canal de  $Na^+$  cardiaco humano Nav1.5 (1.6  $\mu$ g) y para las subunidades auxiliares Nav $\beta$ 1 (1.6  $\mu$ g) (Nav1.5- $\beta$ ). Los resultados demuestran que la coexpresión de los canales Nav1.5- $\beta$

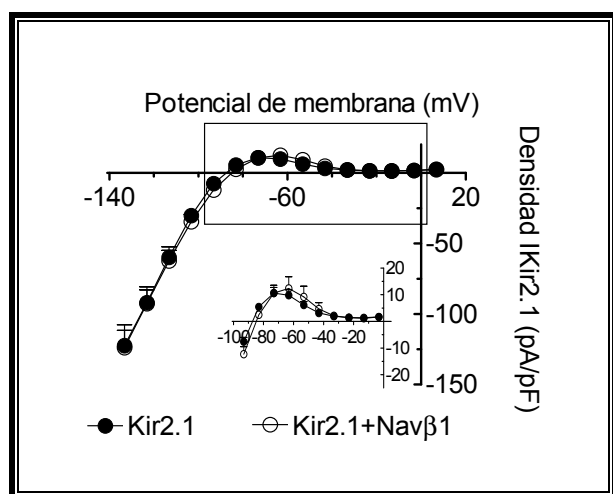


**Figura V.5. (Página anterior). La expresión de Nav1.5 aumenta la densidad de la  $I_{Kir2.1}$ .** (A) Trazos de  $I_{Kir2.1}$  registrados en células CHO que expresaban sólo los canales Kir2.1 (1.6  $\mu$ g) o Kir2.1 + Nav1.5- $\beta$  (1.6:1.6  $\mu$ g) mediante el protocolo de pulsos que se muestra en la parte superior de la figura. (B) Relaciones densidad-voltaje medias construidas para la  $I_{Kir2.1}$  registrada en células que expresaban sólo los canales Kir2.1 o Kir2.1 + Nav1.5- $\beta$  en células CHO. En el recuadro se representan los datos a potenciales positivos para el  $E_K$  en escala expandida. Los potenciales de membrana se han corregido de acuerdo a un LJP de -13.2 mV. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de más de 25 experimentos/células. \* $P < 0.05$  frente a Kir2.1 solo. (ANOVA de una vía seguido del test de Newman-Keuls y modelo multinivel de efectos mixtos).

junto con los canales Kir2.1 incrementaba significativamente la densidad de la  $I_{Kir2.1}$  tanto de entrada (de  $-120.9 \pm 11.8$  pA/pF a  $-192.6 \pm 16.5$  pA/pF, a -120 mV) como de salida (de  $+9 \pm 1.2$  pA/pF a  $+18.1 \pm 3.5$  pA/pF, a -50 mV) ( $n = 31$ ,  $P < 0.05$ ) (Figura V.5A y B). Sin embargo, la coexpresión de Nav1.5- $\beta$  no produjo efectos significativos sobre otras propiedades electrofisiológicas de la  $I_{Kir2.1}$  como la cinética de activación (Figura V.14 y Tabla V.1), el potencial al que se registra la corriente máxima de salida o la pendiente de la rectificación ( $P > 0.05$ ).

La subunidad auxiliar Nav $\beta$ 1 ejerce un efecto chaperona sobre la expresión de los canales Nav1.5 (Qu y cols., 1995), por tanto quisimos descartar que el aumento de la  $I_{Kir2.1}$  fuera consecuencia de la presencia de las subunidades Nav $\beta$ 1.

En la Figura V.6 se demuestra que la cotransfección de Nav $\beta$ 1 con los canales Kir2.1 (en ausencia de Nav1.5) no modificaba significativamente la  $I_{Kir2.1}$  registrada en células CHO. Este resultado confirma que es la subunidad  $\alpha$  del canal de sodio cardíaco la responsable de la modulación positiva de los canales Kir2.1.

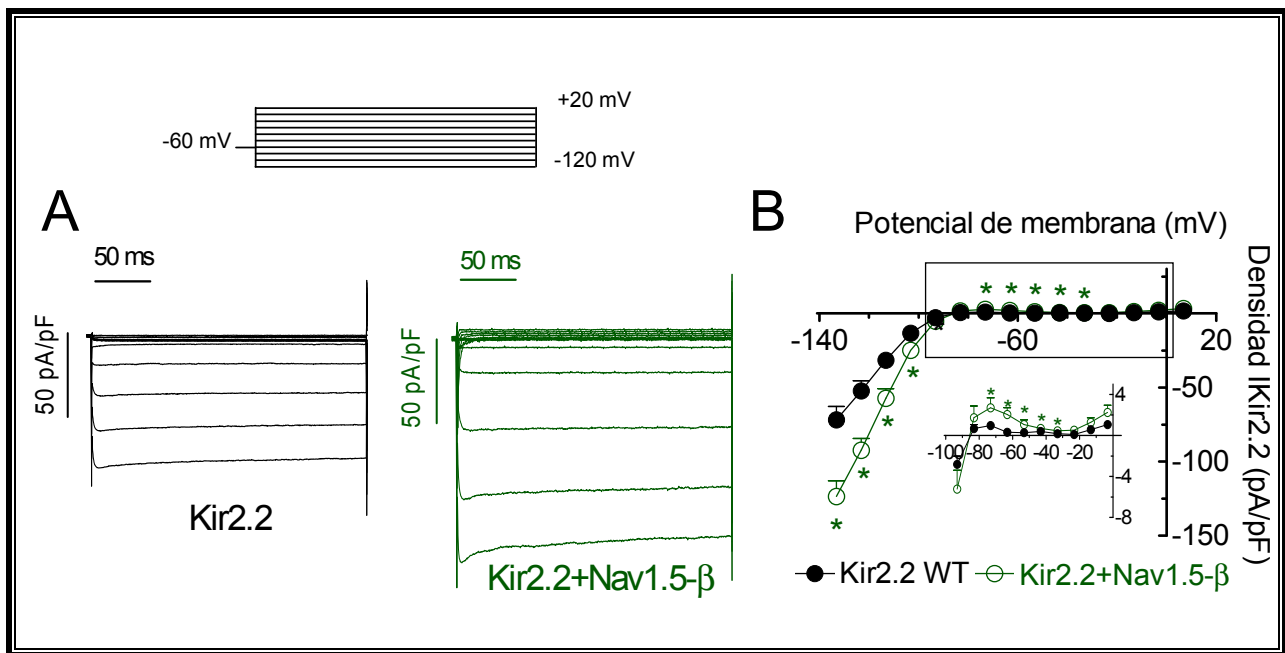


**Figura V.6. La  $I_{Kir2.1}$  no se modifica en presencia de las subunidades Nav $\beta$ 1.** Relaciones densidad-voltaje medias construidas para la  $I_{Kir2.1}$  en células CHO que expresaban sólo Kir2.1 o Kir2.1 + Nav $\beta$ 1. En el recuadro se representan los datos a potenciales positivos para el  $E_K$  en escala expandida. Los potenciales de membrana se han corregido de acuerdo a un LJP de -13.2 mV. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de al menos 6 experimentos en cada grupo. (ANOVA de una vía seguido del test de Newman-Keuls y modelo multinivel de efectos mixtos).

## Resultados

### 1.1.4. Efectos de la expresión de los canales Nav1.5- $\beta$ sobre la $I_{Kir2.2}$ y la $I_{Kir2.3}$

En las Figuras V.7A y V.8A se muestran unas familias de trazos de corriente generada por homotetrámeros de los canales Kir2.2 ( $I_{Kir2.2}$ ) y Kir2.3 ( $I_{Kir2.3}$ ), respectivamente, registrados en células CHO transfectadas transitoriamente con el ADNc de los canales Kir2.x humanos (1.6  $\mu$ g) solos o junto con los ADNc que codifican para los canales humanos Nav1.5 (1.6  $\mu$ g) y para las subunidades Nav $\beta$ 1 (1.6  $\mu$ g) (Nav1.5- $\beta$ ). La cotransfección con los canales Nav1.5- $\beta$  también

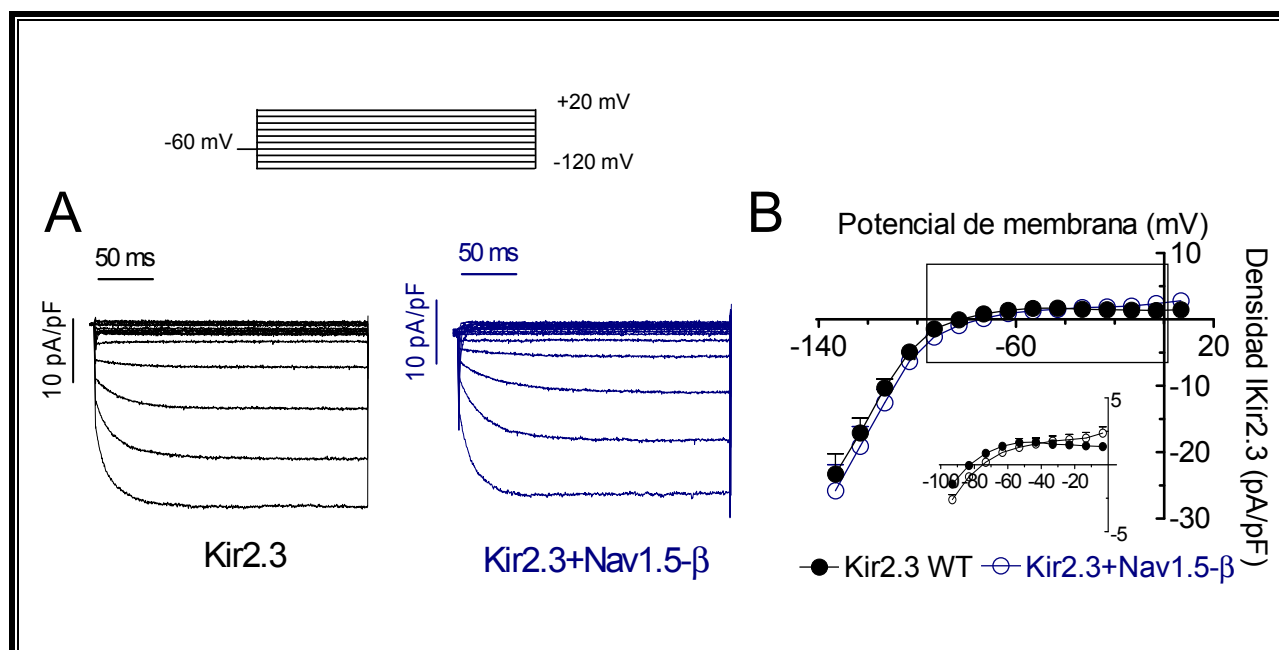


**Figura V.7. La expresión de Nav1.5 aumenta la densidad de la  $I_{Kir2.2}$ .** (A) Trazos de  $I_{Kir2.2}$  registrados en células CHO que expresaban sólo los canales Kir2.2 (1.6  $\mu$ g) o Kir2.2 + Nav1.5- $\beta$  (1.6:1.6  $\mu$ g) mediante el protocolo de pulsos que se muestra en la parte superior de la figura. (B) Relaciones densidad-voltaje medias construidas para la  $I_{Kir2.2}$  registrada en células CHO que expresaban sólo los canales Kir2.2 o Kir2.2 + Nav1.5- $\beta$ . En el recuadro se representan los datos a potenciales positivos para el  $E_K$  en escala expandida. Los potenciales de membrana se han corregido de acuerdo a un LJP de -13.2 mV. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de más de 25 experimentos/células. \* $P < 0.05$  frente a Kir2.2 solo. (ANOVA de una vía seguido del test de Newman-Keuls y modelo multinivel de efectos mixtos).

incrementaba significativamente la densidad de la  $I_{Kir2.2}$  tanto de entrada (de  $-71.9 \pm 9$  pA/pF a  $-123.5 \pm 10.7$  pA/pF, a -120 mV) como la de salida (de  $+0.3 \pm 0.2$  pA/pF a  $+2.1 \pm 0.7$  pA/pF, a -50 mV) ( $n = 30$ ,  $P < 0.05$ ) (Figura V.7A y 7B). De nuevo, la coexpresión de Nav1.5- $\beta$  no produjo efectos significativos sobre otras propiedades electrofisiológicas de la  $I_{Kir2.2}$  como la cinética de activación (Figura V.14 y Tabla V.1), el potencial al que se registra la corriente máxima de salida o la pendiente de la rectificación ( $P > 0.05$ ).

Por el contrario, la Figura V.8A y 8B demuestra que la cotransfección con los canales Nav1.5- $\beta$  no modificaba ni la corriente de entrada ni la de salida generada por los canales Kir2.3 ( $I_{Kir2.3}$ ).

Tampoco se vieron modificadas la cinética de activación (Figura V.14 y Tabla V.1), el potencial al que se registra la corriente máxima de salida o la pendiente de la rectificación ( $P > 0.05$ ) de  $I_{Kir2.3}$ . Por lo tanto, los resultados obtenidos hasta el momento indicaban que los canales Nav1.5- $\beta$  modulan positivamente la expresión de los canales Kir2.1 y Kir2.2, pero no la de los canales Kir2.3.



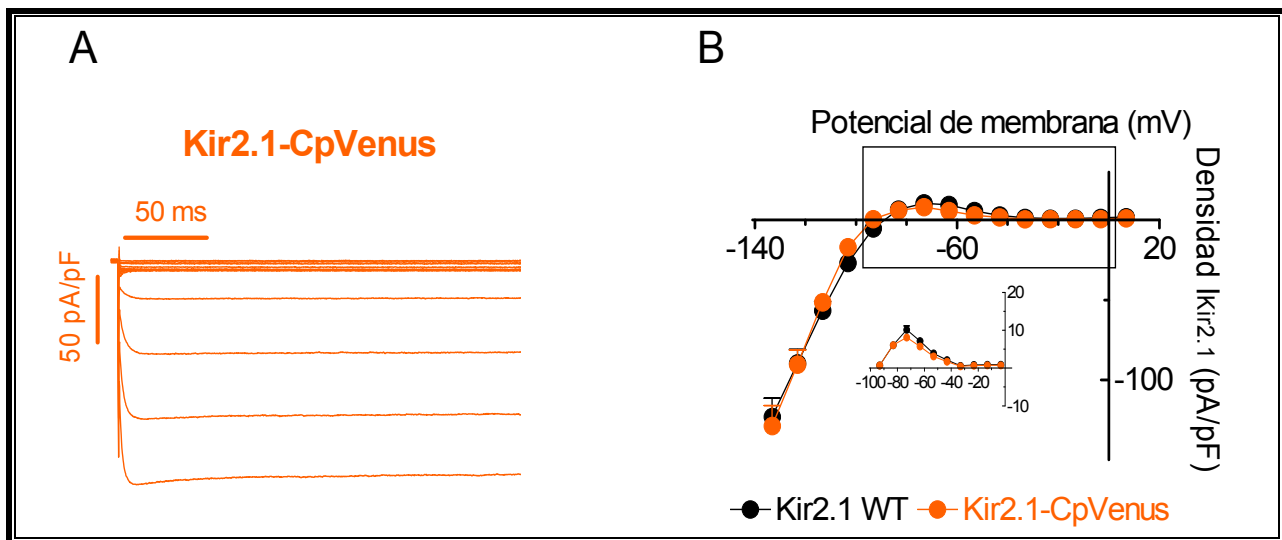
**Figura V.8. La expresión de Nav1.5 aumenta la densidad de la  $I_{Kir2.3}$ .** (A) Trazos de  $I_{Kir2.3}$  registrados en células CHO que expresaban sólo los canales Kir2.3 (1.6  $\mu$ g) o Kir2.3 + Nav1.5- $\beta$  (1.6:1.6  $\mu$ g) mediante el protocolo de pulsos que se muestra en la parte superior de la figura. (B) Relaciones densidad-voltaje medias construidas para la  $I_{Kir2.3}$  registrada en células CHO que expresaban sólo los canales Kir2.3 o Kir2.3 + Nav1.5- $\beta$ . En el recuadro se representan los datos a potenciales positivos al el  $E_K$  en escala expandida. Los potenciales de membrana se han corregido de acuerdo a un LJP de -13.2 mV. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de más de 25 experimentos/células. \* $P < 0.05$  frente a Kir2.3 solo. (ANOVA de una vía seguido del test de Newman-Keuls y modelo multinivel de efectos mixtos).

## 1.2. Efectos de Nav1.5 sobre la expresión de Kir2.1 en la membrana citoplasmática

Los resultados obtenidos hasta ahora demuestran que la coexpresión de los canales Nav1.5 aumenta la densidad de la corriente generada por canales Kir2.1 y Kir2.2. Desde un punto de vista teórico dicho aumento podría ser debido, o bien a un cambio en las propiedades biofísicas del canal que dé lugar a un aumento de su conductancia y/o de su probabilidad de apertura, o bien a un incremento en el número de canales Kir2.1/2.2 presentes en la membrana citoplasmática. Los resultados previos obtenidos por el grupo del Dr. Jalife sugerían que la modulación  $I_{K1}$ - $I_{Na}$  no era consecuencia de cambios biofísicos (Milstein y cols., 2012). Por ello quisimos determinar si la cotransfección de canales Nav1.5 estaría aumentando la expresión de canales Kir2.1 en la membrana citoplasmática. Con este objetivo, se construyó un canal Kir2.1 quimérico (ver Material

## Resultados

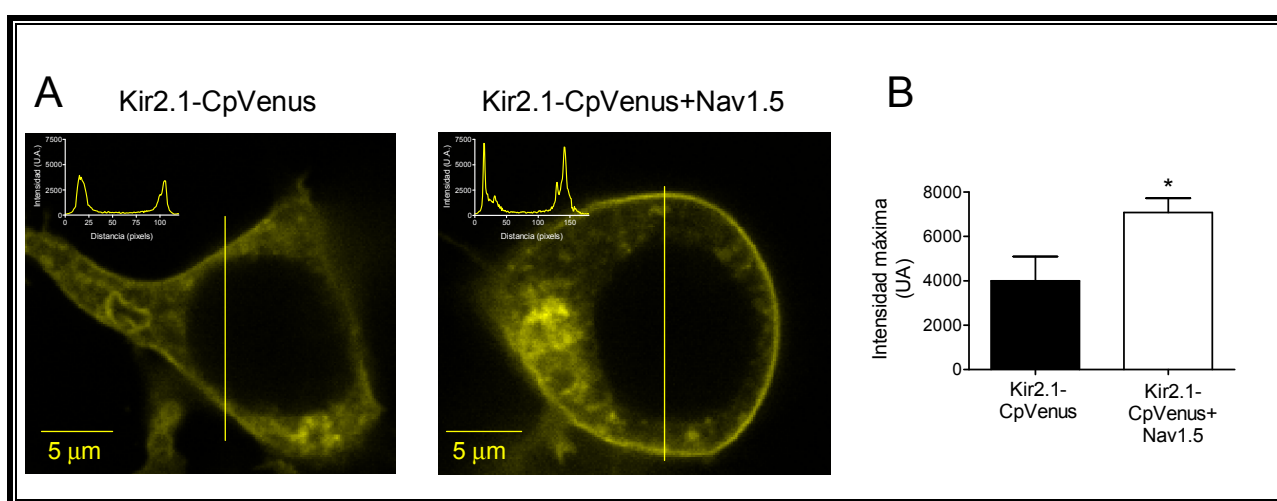
y Métodos) insertando la proteína fluorescente amarilla Cp173Venus antes del extremo N-terminal de Kir2.1 (Kir2.1-CpVenus). Es importante destacar que la introducción de la proteína fluorescente no causó ninguna alteración en las propiedades electrofisiológicas del canal Kir2.1, de tal forma que la corriente generada por los canales Kir2.1-CpVenus era idéntica a la generada por los canales Kir2.1 (Figura V.9)



**Figura V.9. La proteína fluorescente CpVenus no altera las propiedades electrofisiológicas de las corrientes generadas por los canales Kir2.1.** (A) Trazos de  $I_{Kir2.1}$  registrados en células CHO transfectadas con el canal Kir2.1-CpVenus tras aplicar pulsos de 250 ms de duración desde un potencial de fijación de -60 mV hasta potenciales comprendidos entre -120 y +20 mV. (B) Relaciones densidad-voltaje medias para la  $I_{Kir2.1}$  registradas en células CHO que expresaban los canales Kir2.1 o Kir2.1-CpVenus. En el recuadro se representan los datos a potenciales positivos al el  $E_K$  en escala expandida. Los potenciales de membrana se han corregido de acuerdo a un LJP de -13.2 mV. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de más de 5 experimentos/células. (ANOVA seguido del test de Newman-Keuls y modelo multinivel de efectos mixtos).

El plásmido que codificaba esta construcción fue transfectado de forma transitoria en células HEK-293 y, 48 h después de la transfección, se midió la expresión del canal Kir2.1-CpVenus en ausencia y en presencia de Nav1.5 mediante microscopía de fluorescencia. En la Figura V.10A (izquierda) se muestra una imagen obtenida en una célula HEK-293 transfectada con el ADNc que codifica la expresión del canal Kir2.1-CpVenus (1.6  $\mu$ g) sólo. Como puede observarse, la señal fluorescente se distribuye uniformemente por el citoplasma, si bien ésta es más intensa en el borde de la célula. Utilizamos un software de procesamiento de imágenes (ImageJ) que nos permitió cuantificar la señal fluorescente en la región de interés seleccionada (identificada mediante la línea vertical amarilla). En el gráfico situado en la esquina superior izquierda de la imagen, se muestra la intensidad de la señal fluorescente a lo largo de la región seleccionada. La intensidad aumenta marcadamente en las dos zonas que se corresponden con la membrana citoplasmática. En la imagen situada en la parte derecha, se muestra el resultado obtenido en una célula transfectada con canales

Kir2.1-CpVenus conjuntamente con canales Nav1.5 en los que había sido insertada una proteína fluorescente cian (Nav1.5-mTq2) para confirmar visualmente la cotransfección con este canal. Tanto en la imagen, como en el gráfico de la esquina superior izquierda se observa que la intensidad máxima correspondiente a la región de la membrana es mayor que en ausencia de canales Nav1.5. De hecho el promedio calculado para todos los experimentos realizados, demuestran que la cotransfección de canales Nav1.5 duplica la intensidad máxima de la señal fluorescente emitida por los canales Kir2.1-CpVenus ( $P < 0.05$ ) (Figura V.10B). Por todo ello, podemos concluir que el aumento de la  $I_{Kir2.1}$  producido por la coexpresión de canales Nav1.5 es consecuencia de un aumento de la expresión de los canales Kir2.1 en la membrana citoplasmática.



**Figura V.10. La expresión de Nav1.5 aumenta la expresión de los canales Kir2.1 en la membrana citoplasmática.** (A) Imágenes de microscopía confocal en las que se muestran dos células HEK-293 transfectadas con los canales Kir2.1 unidos a la proteína fluorescente amarilla Cp173 Venus (Kir2.1-CpVenus) en ausencia (izquierda) o en presencia de canales Nav1.5 (derecha). En la parte superior izquierda de cada imagen, se representa la intensidad de fluorescencia a lo largo de la región seleccionada de la célula (representada por la línea vertical amarilla). (B) Valores medios de intensidad máxima (correspondiente a la región de la membrana citoplasmática) medidos en células transfectadas con canales Kir2.1-CpVenus con o sin Nav1.5. Cada barra representa la media  $\pm$  EEM de 5 células en cada grupo. \* $P < 0.05$  frente a Kir2.1-CpVenus solo. (Prueba de la  $t$  de Student).

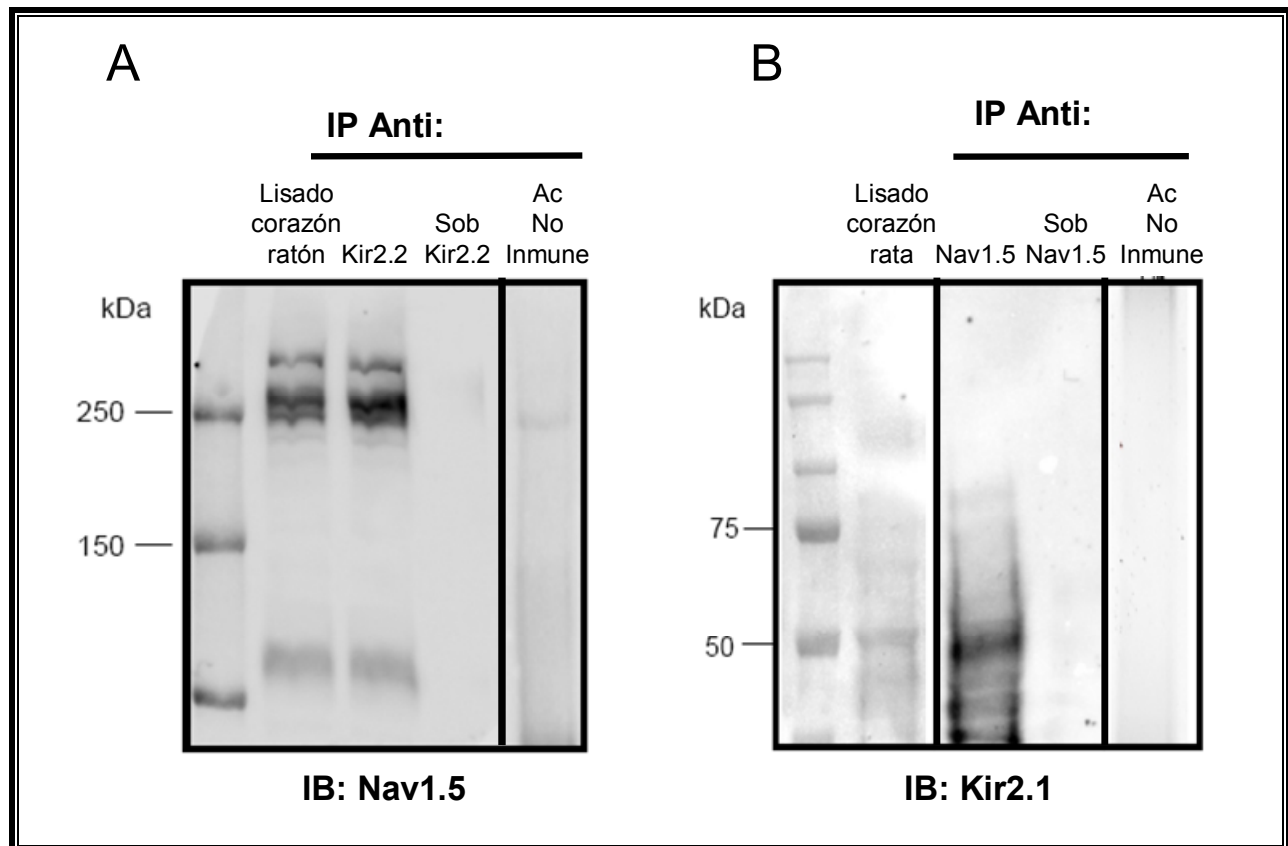
### 1.3. Estudios de interacción entre los canales Nav1.5 y Kir2.x

En los siguientes grupos de experimentos, quisimos determinar si existe una interacción física entre las proteínas que forman los canales Kir2.1/Kir2.2 y los canales Nav1.5, reforzando la hipótesis de que pueden formar parte del mismo canalosoma. Con este objetivo se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación y de ligación por proximidad (PLA).

## Resultados

### 1.3.1. Ensayos de co-inmunoprecipitación entre los canales Nav1.5 y Kir2.x

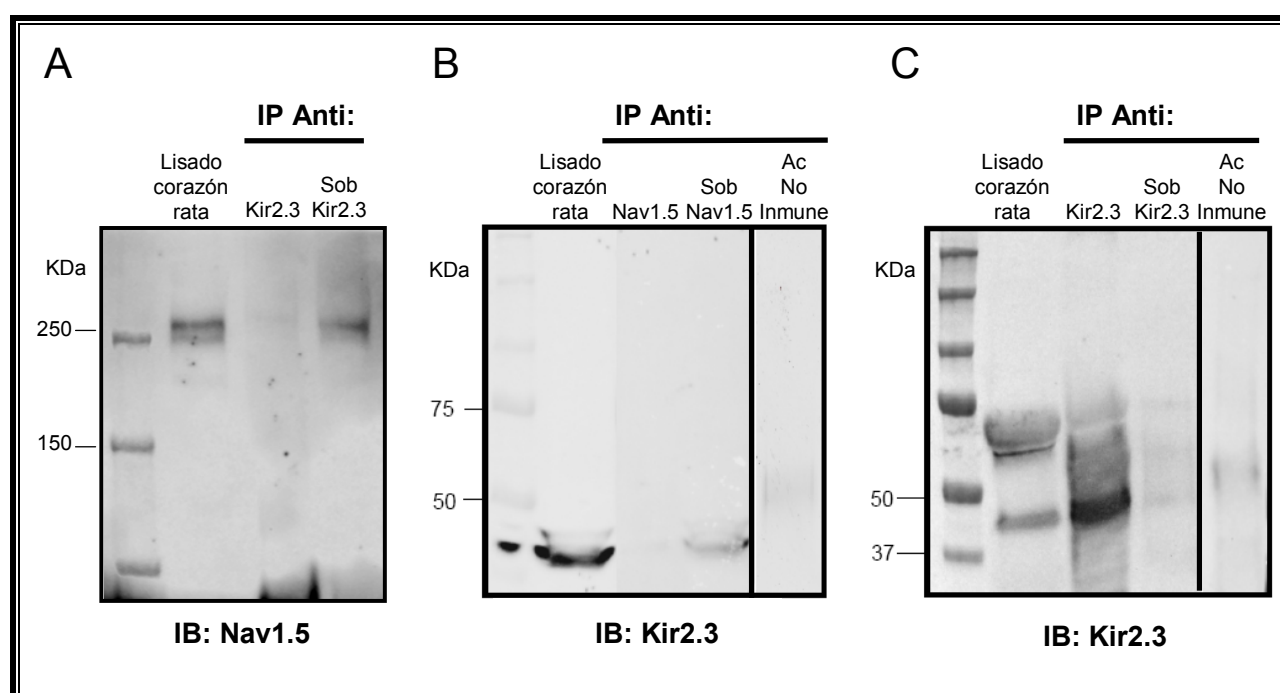
El ensayo de co-inmunoprecipitación de proteínas permite detectar interacciones proteína-proteína gracias a la utilización de un anticuerpo específico que permite aislar la proteína A en una muestra, y detectar posteriormente mediante *western blot* la presencia de la proteína B, solamente si ésta se encontraba originalmente unida a la proteína A (ver Material y Métodos).



**Figura V.11. Los canales Kir2.1 y Kir2.2 interaccionan con el canal Nav1.5 en corazón de rata y ratón.** (A) La proteína Nav1.5 inmunoprecipita con el canal Kir2.2. El canal Nav1.5 fue detectado por *western blot* en lisado de corazón de ratón. Todas las reacciones de inmunoprecipitación ( $n = 4$ ) se realizaron con preparaciones enriquecidas de membrana de ventrículos de ratón ( $N = 2$ ), puesto que el canal Kir2.2 no se pudo detectar con los anticuerpos utilizados en corazones de rata. (B) El canal Kir2.1 inmunoprecipita con el canal Nav1.5. El canal Kir2.1 fue detectado por *western blot* en lisado de corazón de rata. Todas las reacciones de inmunoprecipitación ( $n = 4$ ) se realizaron con preparaciones enriquecidas de membrana de ventrículos de rata ( $N = 3$ ). Todos los lisados y sus correspondientes co-inmunoprecipitaciones se cargaron en el mismo gel los carriles fueron separados únicamente (línea continua) al incubarlos con anticuerpos secundarios diferentes. IP, anticuerpo utilizado para la inmunoprecipitación. IB, anticuerpo utilizado para *immunoblotting*. En los paneles A y B los lisados se trataron con una IgG (y proteína A/G) no específica y fueron utilizados (“Ac no inmune”) como control negativo. También se muestra el sobrenadante (Sob) recuperado después de la centrifugación de los experimentos de inmunoprecipitación.

Debido a que en trabajos anteriores se había demostrado mediante experimentos de co-inmunoprecipitación la interacción entre Kir2.1 y Nav1.5 (Milstein y cols., 2012), se decidió comprobar si Nav1.5 interaccionaba con los canales Kir2.2 y Kir2.3, presentes también en tejido

cardíaco. En las Figuras V.11A y V12A se muestran los resultados obtenidos al determinar la posible co-inmunoprecipitación de Nav1.5 con Kir2.2 y Kir2.3. En ellas se puede observar (de izquierda a derecha): a) un primer carril donde aparece un marcador de pesos moleculares; b) un segundo carril donde se muestra la detección de los canales Nav1.5 en el lisado ventricular de ratón (Figura V.11.A) o de rata (Figura V.12.A) mediante *western blot* (con un peso molecular cercano a 250 KDa); c) un tercer carril en el cual se muestra el resultado de la co-inmunoprecipitación. En este caso se observa que los complejos proteicos procedentes del lisado de corazón e inmunoprecipitados con el anticuerpo que reconoce los canales Kir2.2 poseen canales Nav1.5 (Figura V.11A), pero los complejos proteicos inmunoprecipitados con el anticuerpo que reconoce los canales Kir2.3 no poseen canales Nav1.5 (Figura V.12A); d) un cuarto carril que demuestra que Nav1.5 no está en el sobrenadante de la co-inmunoprecipitación con los anticuerpos que reconocen los canales Kir2.2 (Figura V.11A), pero sí en los que reconocen Kir2.3 (Figura V.12A). Si hubiera interacción entre la proteína inmunoprecipitada (Kir2.2 o Kir2.3) y la proteína analizada mediante *western blot* (Nav1.5), ésta última no aparecería en el sobrenadante (caso de los canales Kir2.2 y



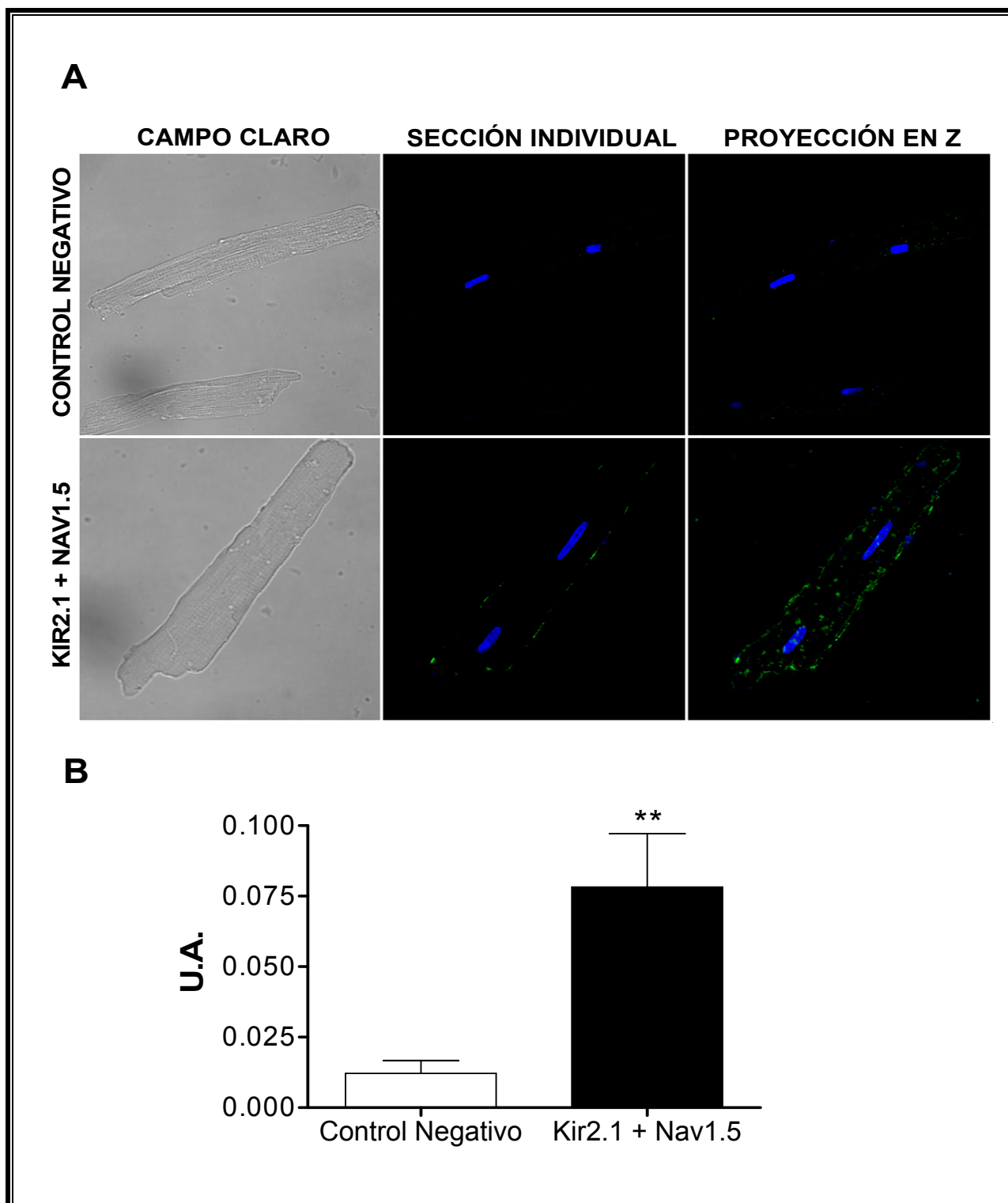
**Figura V.12. El canal Kir2.3 no interacciona con el canal Nav1.5 en corazón de rata.** (A) El canal Nav1.5 fue detectado por *western blot* en lisado de corazón pero no inmunoprecipitaba con el canal Kir2.3 ( $n = 3$ ). También se muestra el sobrenadante (Sob) recuperado después de la centrifugación del inmunoprecipitado del canal Kir2.3. (B) El canal Kir2.3 no inmunoprecipita con el canal Nav1.5. Kir2.3 fue detectado por *western blot* en lisado de corazón. (C) Como control positivo, la imagen muestra que Kir2.3 inmunoprecipita con el anticuerpo utilizado para co-inmunoprecipitar Kir2.3. Todas las reacciones de inmunoprecipitación ( $n = 4$ ) se realizaron con preparaciones enriquecidas de membrana de ventrículos de rata ( $N = 3$ ) y todos los lisados y sus correspondientes co-inmunoprecipitaciones se corrieron en el mismo gel, los carriles fueron únicamente separados (línea continua) cuando se utilizaron anticuerpos diferentes (B y C). IP, anticuerpo utilizado para la inmunoprecipitación. IB, anticuerpo utilizado para *immunoblotting*. En los paneles C y D los lisados se trataron con una IgG (y proteína A/G) no específica y fueron utilizados (“Ac no inmune”) como control negativo.

## Resultados

Nav1.5 en la Figura V.11A). Si no hubiera interacción entre la proteína inmunoprecipitada y la proteína analizada mediante *western blot*, ésta última aparecería al analizar el sobrenadante (caso de los canales Kir2.3 y Nav1.5 en la Figura V.12A). Como control negativo (quinto carril) se llevó a cabo la inmunoprecipitación utilizando un anticuerpo inespecífico (anticuerpo no inmune) que demuestra la especificidad de los resultados obtenidos. Todos estos resultados demuestran que el canal Nav1.5 co-inmunoprecipitaba con el canal Kir2.2 pero no con el canal Kir2.3. La Figura V.11.C confirma que el canal Kir2.3 (banda entre 50 y 37 KDa) inmunoprecipitaba con el anticuerpo de Kir2.3 utilizado, lo cual descartaba que los resultados que indicaban que los canales Kir2.3 no co-inmunoprecipitan con los Nav1.5- $\beta$  fueran debidos a la falta de afinidad del anticuerpo. Para confirmar los resultados obtenidos, realizamos la co-inmunoprecipitación a la inversa, es decir, se utilizó en primer lugar el anticuerpo frente al canal Nav1.5 y a continuación se detectó la presencia de Kir2.x en el inmunoprecipitado. En estas condiciones, confirmamos que el canal Kir2.1 (banda cercana a los 50 KDa), pero no el canal Kir2.3, co-inmunoprecipitaba con el canal Nav1.5 (Figuras V.11B y V.12B).

### 1.3.2. Ensayo de ligación por proximidad entre los canales Nav1.5 y Kir2.1 en la membrana de miocitos ventriculares de rata

Como se ha descrito anteriormente (ver Material y Métodos), el ensayo de ligación por proximidad, PLA (*Proximity Ligation Assay*) permite la detección *in situ* de proteínas que están situadas entre sí a una distancia menor a 40 nm utilizando microscopía de fluorescencia (Söderberg y cols., 2006). Los ensayos de PLA fueron llevados a cabo en miocitos ventriculares de rata sin permeabilizar, lo que permitió determinar la posible interacción proteína-proteína exclusivamente en la membrana plasmática. Como se puede observar en las imágenes de campo claro mostradas en los recuadros de la parte izquierda de la Figura V.13A, los miocitos fueron fijados con éxito conservando su morfología y estriaciones características. Se realizaron dos grupos de experimentos: a) un grupo control (Control Negativo) en el que se llevó a cabo el ensayo de PLA sin utilizar los anticuerpos primarios frente a los canales Kir2.1 y Nav1.5, únicamente añadiendo los anticuerpos secundarios especiales unidos a aptámeros de ADN y llevando a cabo la amplificación del ADN con nucleótidos marcados con una sonda fluorescente (ver Material y Métodos). La ausencia de señal fluorescente demostraba que no había interacciones inespecíficas ni artefactos experimentales que pudieran interferir en las determinaciones (Figura V.13A, parte superior), y b) el grupo problema en el que el ensayo de PLA se realizó utilizando anticuerpos primarios que se unían tanto



**Figura V.13. El canal Kir2.1 interacciona con el canal Nav1.5 en la membrana de miocitos ventriculares de rata adulta.** (A) Análisis mediante ensayo de ligación por proximidad (PLA) de la interacción de Kir2.1 y Nav1.5 en la membrana. El ensayo de PLA se llevó a cabo sin permeabilizar la membrana de los miocitos utilizando anticuerpos que identificaban una secuencia extracelular de los dos canales. El control negativo se realizó sin añadir los anticuerpos primarios. La proyección en Z es la suma de todas las secciones obtenidas por microscopía confocal. (B) Media de las intensidades de la señal fluorescente medidas en las proyecciones en Z en distintos miocitos ventriculares de rata. Cada barra representa la media  $\pm$  EEM de 5 experimentos/miocitos de dos ratas distintas. En B, \*\*  $P < 0.01$  frente al control negativo. U.A., pixeles en verde/ pixeles totales. En azul núcleo teñido con DAPI, en verde señal PLA (interacción entre Kir2.1 y Nav1.5). (Prueba de la  $t$  de Student).

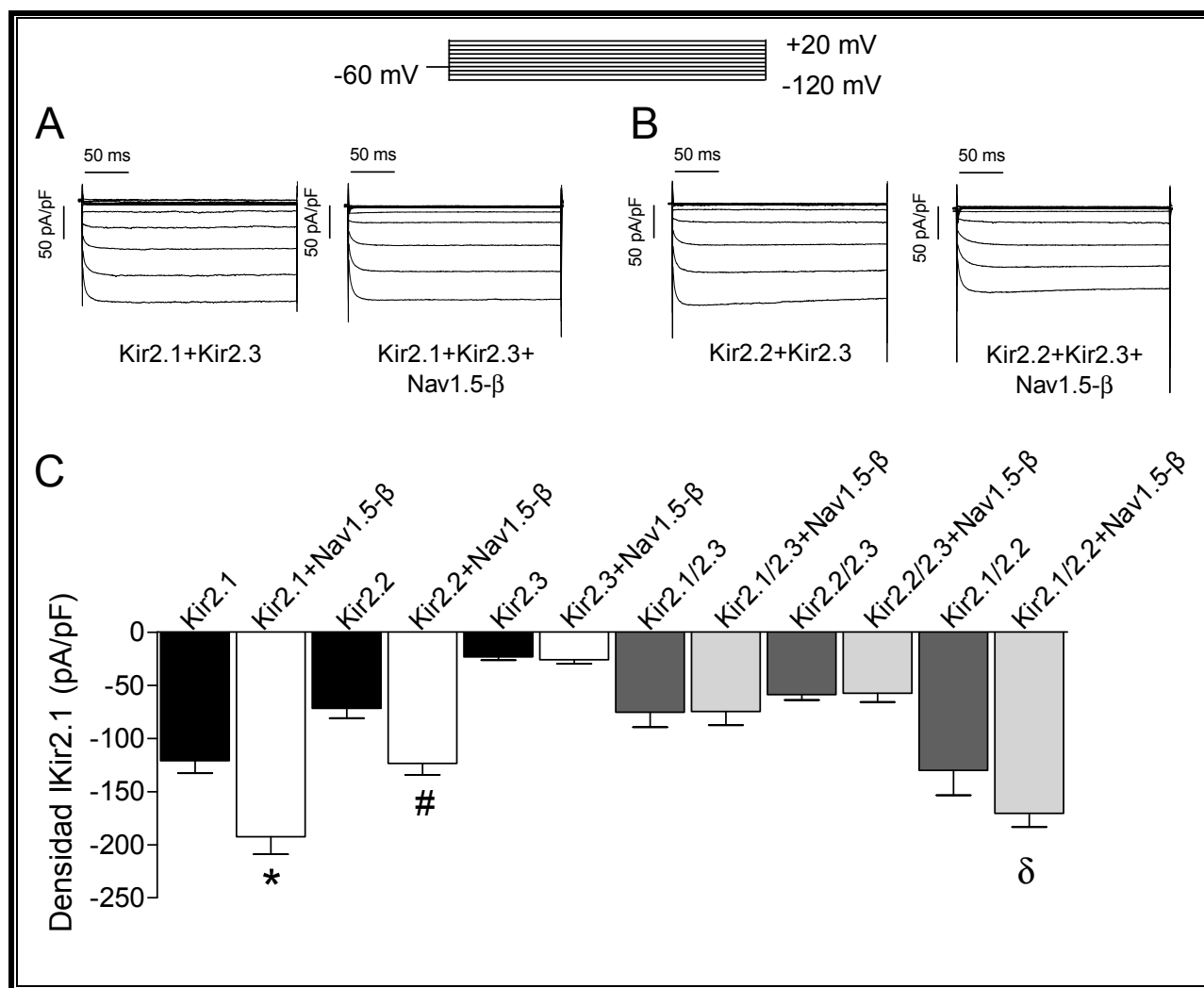
## Resultados

a Kir2.1 como a Nav1.5 en una región extracelular de los canales, para posteriormente añadir los anticuerpos secundarios especiales unidos a aptámeros de ADN y llevar a cabo la amplificación del ADN con nucleótidos marcados fluorescentemente (ver Material y Métodos). Utilizando microscopía confocal de fluorescencia se obtuvieron imágenes de diferentes secciones en el eje Z para cada célula. En el centro de la Figura V.13A recuadro inferior, se muestra la imagen correspondiente a la sección central de la célula. Como se puede observar, en el contorno de la célula aparece señal fluorescente (verde) que demuestra que existe interacción entre los canales Kir2.1 y Nav1.5 a nivel de la membrana plasmática de los miocitos. Asimismo, en la Figura V.13A (parte inferior, derecha) se muestra la superposición de todas las secciones adquiridas en el eje Z, lo que da lugar a una señal fluorescente más intensa, correspondiente al contorno de la célula y a la parte superior e inferior de la membrana. En la figura V.13B se muestra la media de las intensidades de la señal fluorescente medidas en las proyecciones en Z de los miocitos ventriculares de rata utilizados en estos experimentos, siendo la intensidad de la señal significativamente mayor para el ensayo de PLA para Kir2.1 + Nav1.5 que para el control ( $P < 0.01$ ). Por lo tanto, estos resultados demuestran que los canales Kir2.1 y Nav1.5 interactúan físicamente (se sitúan a una distancia menor de 40 nm entre sí) en la membrana celular.

### 1.4. Efectos de la expresión de Nav1.5- $\beta$ sobre las corrientes generadas por heterotetrámeros de Kir2.x

Los datos experimentales sugieren que la  $I_{K1}$  ventricular humana está generada principalmente por homotetrámeros de Kir2.1, mientras que en la  $I_{K1}$  auricular humana juegan un papel fundamental los homo y heterotetrámeros de Kir2.3 (Wang y cols., 1998; Gaborit y cols., 2007; Caballero y cols., 2010a, Amorós y cols., 2013). Para analizar los efectos de la expresión de los canales Nav1.5 sobre la corriente generada por diferentes heterotetrámeros de Kir2.x, las células CHO fueron cotransfectadas (0.8:0.8  $\mu\text{g}$ ) con los canales Kir2.1 y Kir2.2 (Kir2.1/2.2), Kir2.1 y Kir2.3 (Kir2.1/2.3), o Kir2.2 y Kir2.3 (Kir2.2/2.3) y sus corrientes fueron comparadas con aquellas

**Figura V.14. (Página siguiente) La expresión de al menos una subunidad Kir2.3 en heterotetrámeros de Kir2.x impide la modulación recíproca positiva de los canales Kir2.x – Nav1.5.** (A) Familia de trazos de corriente registrada en células que expresaban canales Kir2.1 + Kir2.3 (0.8:0.8  $\mu\text{g}$ ) o cuando eran cotransfectadas junto con las subunidades Nav1.5- $\beta$  (1.6:1.6  $\mu\text{g}$ ). (B) Familia de trazos de corriente registrados en células que expresaban canales Kir2.2 + Kir2.3 (0.8:0.8  $\mu\text{g}$ ) o cuando eran cotransfectadas junto con las subunidades Nav1.5- $\beta$  (1.6:1.6  $\mu\text{g}$ ). En la parte superior de los paneles A y B, se muestra el protocolo de pulsos aplicado para registrar las corrientes  $I_{\text{Kir}2.x}$ . (C) Densidad de las corrientes  $I_{\text{Kir}2.x}$  registradas a -120 mV en células transfectadas con homo y heterotetrámeros de Kir2.x en ausencia o en presencia de Nav1.5- $\beta$ . En C, \*  $P < 0.05$  frente a Kir2.1, #  $P < 0.05$  frente a Kir2.2, y  $\delta P < 0.05$  frente a Kir2.1 + Kir2.2. Cada barra representa la media  $\pm$  EEM de al menos 25 experimentos/células (ANOVA seguido del test de Newman-Keuls y modelo multinivel de efectos mixtos).



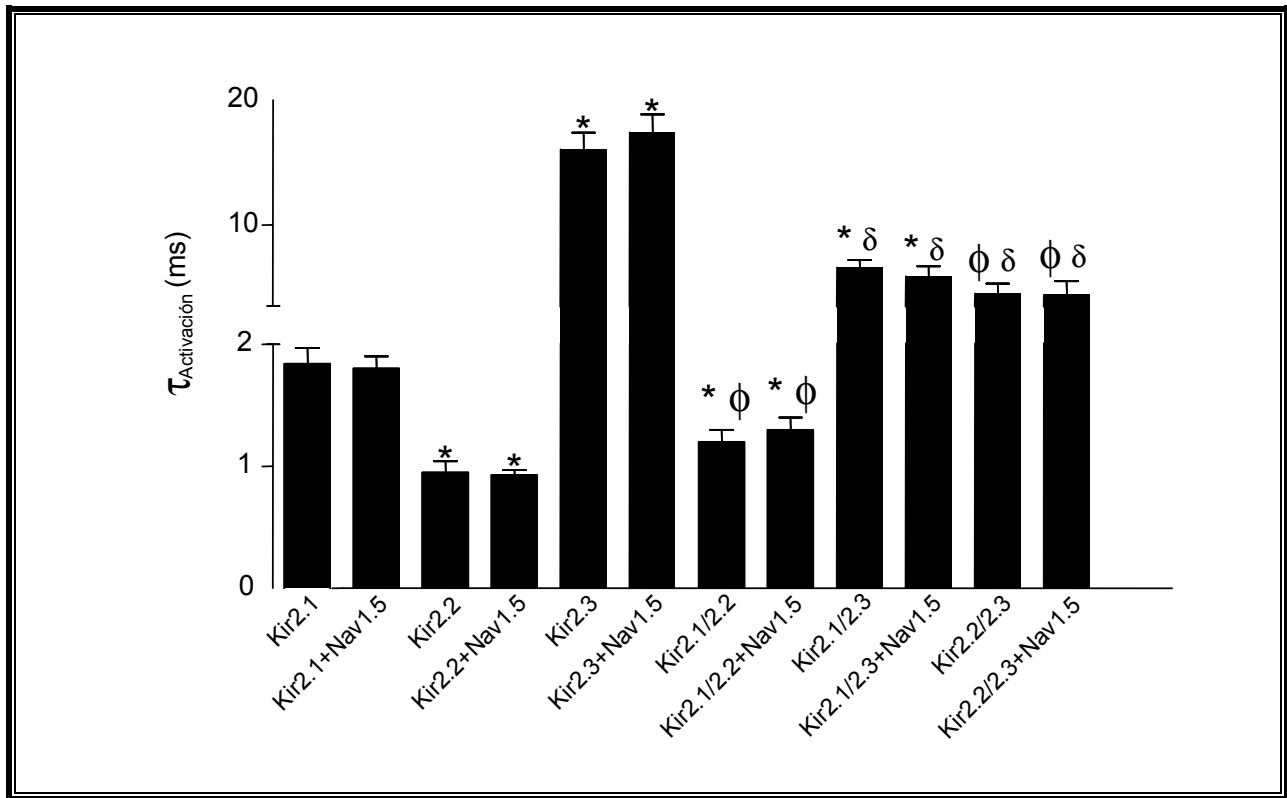
generadas en células que además fueron transfectadas con Nav1.5-β (1.6:1.6 μg) (Figura V.14). Las corrientes generadas por los canales Kir2.1/Kir2.2, Kir2.1/Kir2.3 y Kir2.2/Kir2.3 presentaban cinéticas de activación con valores intermedios y significativamente diferentes a las cinéticas de las corrientes generadas por canales homotetraméricos, demostrando la naturaleza heterotetramérica de

|                 | Kir2.1    | Kir2.2       | Kir2.3       | Kir2.1/Kir2.2 | Kir2.1/Kir2.3 | Kir2.2/Kir2.3 |
|-----------------|-----------|--------------|--------------|---------------|---------------|---------------|
| <b>0</b>        | 1.8 ± 0.1 | 1 ± 0.1 *    | 16.1 ± 1.4 * | 1.2 ± 0.1 * Φ | 6.6 ± 0.6 * δ | 4.5 ± 0.8 Φ δ |
| <b>+ Nav1.5</b> | 1.8 ± 0.1 | 0.9 ± 0.04 * | 17.4 ± 1.4 * | 1.3 ± 0.1 * Φ | 5.9 ± 0.8 * δ | 4.4 ± 1.1 Φ δ |

**Tabla V.1. Valores de las cinéticas de tiempo de activación de las corrientes  $I_{Kir2.x}$ .** Constantes de tiempo de activación obtenida ajustando a una función monoexponencial los trazos registrados a -120 mV de las corrientes  $I_{Kir2.x}$  para las construcciones indicadas. Cada valor representa la media ± EEM de al menos 5 experimentos/células. \*  $P < 0.05$  frente a células transfectadas con Kir2.1 solo o junto con Nav1.5-β. Φ  $P < 0.05$  frente a células transfectadas con Kir2.2 solo o junto con Nav1.5-β. δ  $P < 0.05$  frente a células transfectadas con Kir2.3 solo o junto con Nav1.5-β. (ANOVA seguido del test de Newman-Keuls y modelo multinivel de efectos mixtos).

## Resultados

los canales (Figura V.15 y Tabla V.1). Al contrario de lo observado en células que expresaban las subunidades Kir2.1 y/o Kir2.2, la cotransfección con Nav1.5- $\beta$  no incrementaba la densidad de  $I_{Kir2.x}$  en células que expresaban canales heterotetraméricos que contenían subunidades Kir2.3 (Figura V.14).



**Figura V.15. Cinéticas de tiempo de activación de las corrientes  $I_{Kir2.x}$ .** Gráfico de barras donde se muestra la constante de tiempo de activación obtenida ajustando a una función monoexponencial los trazos registrados a -120 mV de las corrientes  $I_{Kir2.x}$  para las construcciones indicadas. Cada barra representa la media  $\pm$  EEM de al menos 5 experimentos/células. \*  $P < 0.05$  frente a células transfectadas con Kir2.1 solo o junto con Nav1.5- $\beta$ .  $\phi$   $P < 0.05$  frente a células transfectadas con Kir2.2 solo o junto con Nav1.5- $\beta$ .  $\delta$   $P < 0.05$  frente a células transfectadas con Kir2.3 solo o junto con Nav1.5- $\beta$ . (ANOVA seguido del test de Newman-Keuls y modelo multinivel de efectos mixtos).

## 2. PAPEL DE LA SECUENCIA DE UNIÓN A DOMINIOS PDZ DE LOS CANALES Kir2.x

Tal y como se mencionaba en la Introducción, se había propuesto que la modulación recíproca positiva entre los canales Nav1.5 y Kir2.1 dependía de la unión de los canales Kir2.1 y Nav1.5 a los dominios PDZ de la proteína de anclaje de la familia MAGUK SAP97, a través de sus motivos de unión a PDZ situados en los extremos C-terminales (Milstein y cols., 2012). Los canales Kir2.1 y Kir2.2 presentan el mismo motivo de unión a PDZ en el extremo C-terminal (SEI), mientras que en el canal Kir2.3 es diferente (SAI) (Leonoudakis y cols., 2001; 2004a; 2004b) (Figura V.16). Por lo

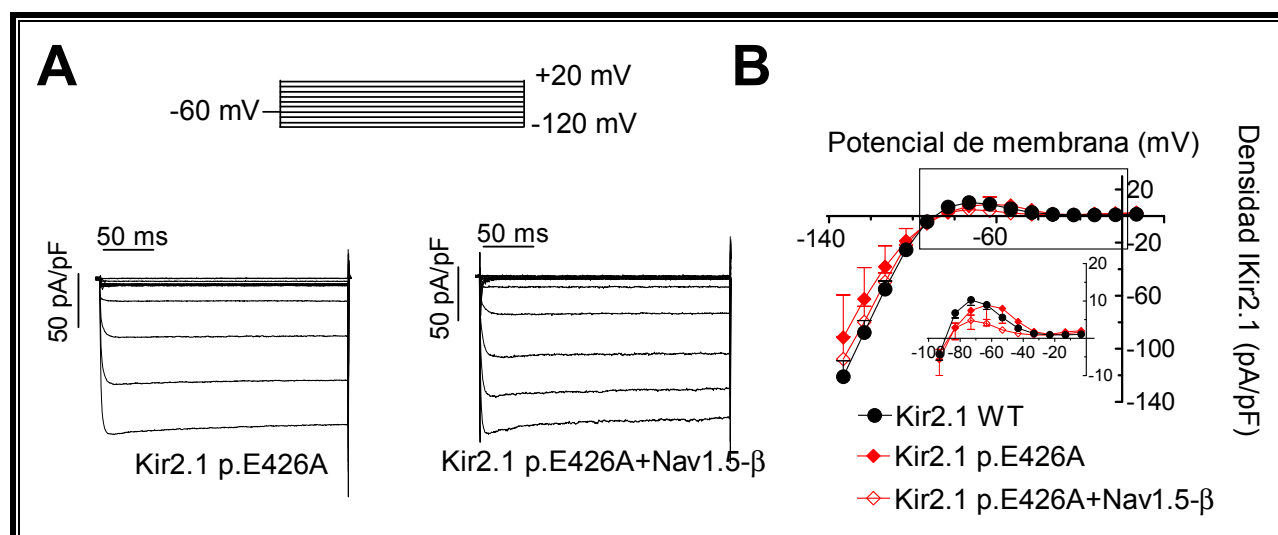
tanto, se analizó si esta variación podría ser la responsable de las diferencias en la modulación de Nav1.5- $\beta$  sobre Kir2.1/2.2 y Kir2.3.

|        |      |              |     |
|--------|------|--------------|-----|
| KIR2.1 | p.11 | leprplrresei | p.0 |
| KIR2.2 | p.11 | leqrpyrresei | p.0 |
| KIR2.3 | p.11 | ldnisyrresai | p.0 |

**Figura V.16.** Alineamiento de la secuencia de los últimos 12 aminoácidos de los canales Kir2.x. El dominio de unión a PDZ del extremo C-terminal de los canales Kir2.1 y Kir2.2 es idéntico (SEI), pero ambos son distintos del de Kir2.3 (SAI). Siguiendo la convención aceptada, las posiciones de los péptidos fueron numeradas desde el último residuo (posición 0, p.0).

## 2.1. Efectos de mutaciones en el dominio de unión a PDZ de canales Kir2.x en la modulación recíproca de la $I_{Kir2.x}$

Para el estudio del papel de la secuencia de unión a dominios PDZ, se realizaron experimentos de mutagénesis dirigida con el objeto de construir canales Kir2.x quiméricos en los que se sustituyeron las secuencias de unión a dominios PDZ de los canales Kir2.1 y Kir2.2 generando

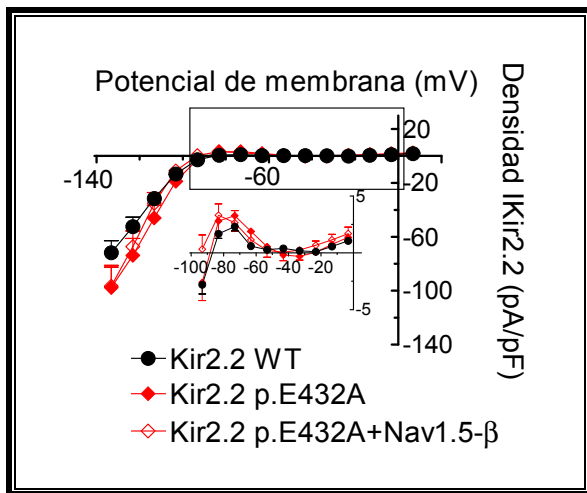


**Figura V.17.** El dominio de unión a PDZ de los canales Kir2.1 es necesario para la modulación positiva producida por el canal Nav1.5. (A) Trazos de  $I_{Kir2.1 E426A}$  registrados en células que expresaban solo canales Kir2.1 p.E426A o Kir2.1 p.E426A + Nav1.5- $\beta$  utilizando el protocolo de pulsos que se muestra en la parte superior. (B) Relaciones densidad de corriente-voltaje media construidas para corrientes registradas en células CHO que expresaban canales Kir2.1 WT y mutante solos o conjuntamente con Nav1.5- $\beta$ . En B el recuadro muestra los datos a potenciales positivos del  $E_K$  en escala expandida. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de más de 25 experimentos/células. (ANOVA seguido del test de Newman-Keuls y modelo multinivel de efectos mixtos).

## Resultados

canales Kir2.1 y Kir2.2 que contenían la secuencia de unión a PDZ del canal Kir2.3 (Kir2.1 p.E426A y Kir2.2 p.E432A, respectivamente). Como se puede observar en la Figura V.17 tanto en las familias de trazos de corriente (A) como en las relaciones densidad de corriente-voltaje (B), la corriente generada por los canales Kir2.1 p.E426A no presentaba diferencias significativas en la densidad de corriente y en la cinética de activación respecto a la de la corriente generada por los canales Kir2.1 WT. Sin embargo, es muy importante destacar que la cotransfección de Nav1.5- $\beta$  con el canal Kir2.1 p.E426A no incrementaba la densidad de  $I_{\text{Kir2.1 p.E426A}}$ .

De forma similar, observamos que la mutación p.E432A no producía cambios significativos en las propiedades electrofisiológicas de Kir2.2, sin embargo, como se puede observar en las relaciones densidad de corriente- voltaje de la Figura V.18, la cotransfección de Nav1.5- $\beta$  con el

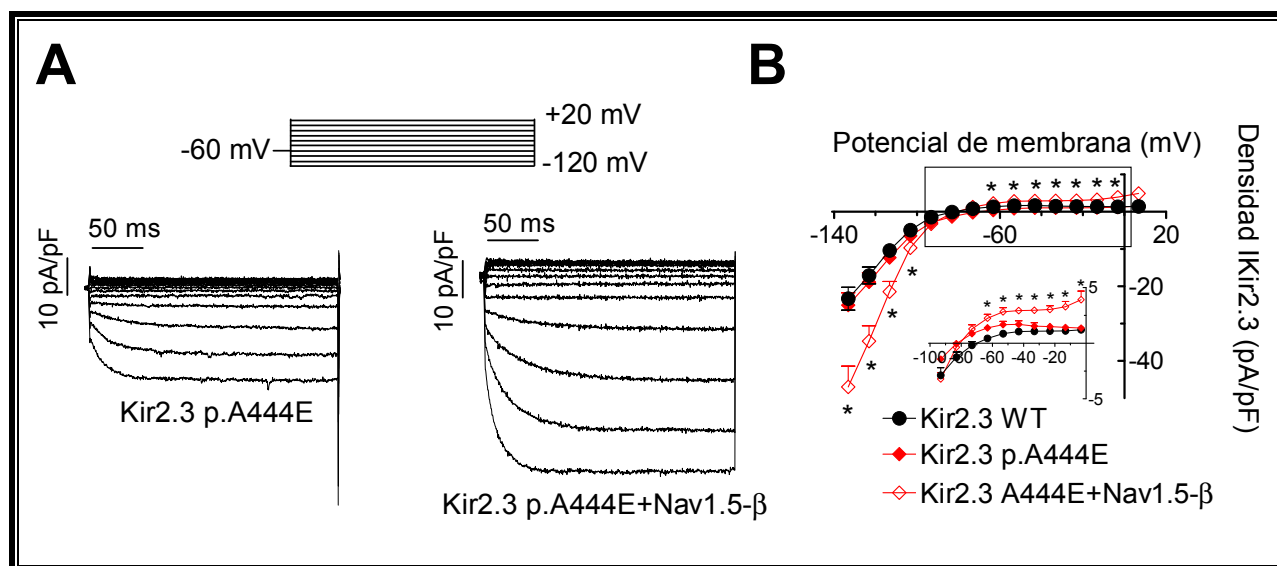


**Figura IV.18. El dominio de unión a PDZ de los canales Kir2.2 es necesario para la modulación positiva producida por el canal Nav1.5.** Relaciones densidad de corriente-voltaje medias construidas para corrientes registradas en células que expresaban canales Kir2.2 WT y mutante solos o conjuntamente con Nav1.5- $\beta$ . En el recuadro se muestran los datos a potenciales positivos del  $E_K$  en escala expandida. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de más de 25 experimentos/células. (ANOVA seguido del test de Newman-Keuls y modelo multinivel de efectos mixtos).

canal Kir2.2 p.E432A no incrementaba la densidad de  $I_{\text{Kir2.2 E432A}}$ . Todos estos resultados indicaban que la sustitución del residuo ácido Glutámico en posición 1 (p1) por una Alanina suprimía la modulación positiva de los canales Kir2.1 y Kir2.2 por parte de Nav1.5.

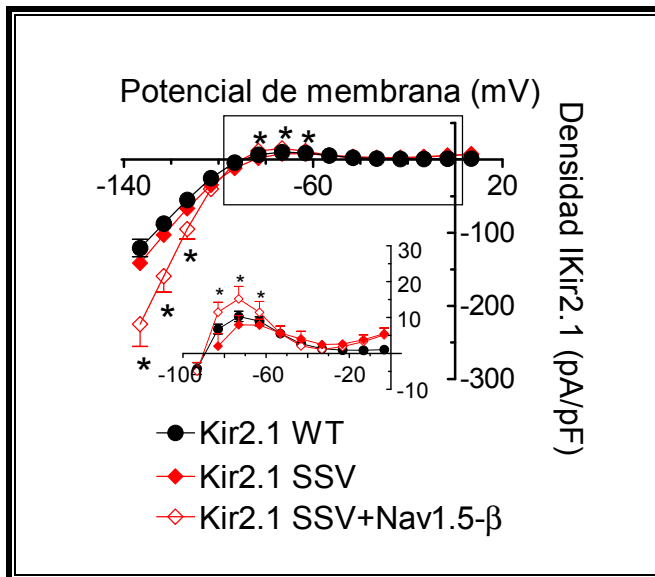
A continuación se generaron canales Kir2.3 con la secuencia de unión a PDZ de los canales Kir2.1-2.2 (Kir2.3 p.A444E). Como se muestra en la Figura V.19, la introducción de esta mutación, no produjo cambios significativos ni en la densidad de la corriente, ni en la cinética de activación de  $I_{\text{Kir2.3}}$ . Sin embargo, llama la atención que como se muestra en la Figura V.19A y 19B, la cotransfección de Nav1.5- $\beta$  con el canal Kir2.3 p.A444E incrementaba significativamente tanto la corriente de entrada como la de salida de estos canales. Todos estos resultados demostrarían que la presencia de un ácido glutámico en posición p1 del motivo de unión a dominios PDZ de los canales Kir2.x es crítica para que se produzca la modulación positiva por parte de los canales Nav1.5. Además, sugerían que dicha modulación positiva podría implicar la interacción de los canales

Kir2.x con una proteína que presente dominios PDZ y que pudiera unirse a Kir2.1 y Kir2.2, pero no a Kir2.3.



**Figura V.19.** El dominio de unión a PDZ de los canales Kir2.1 y Kir2.2 introducido en los canales Kir2.3 es necesario para la interacción positiva con el canal Nav1.5. Arriba del panel. Izquierda, protocolo utilizado para registrar A. (A) Trazos de  $I_{Kir2.3 p.A444E}$  registrados en células que expresaban solo canales Kir2.3 p.A444E o Kir2.3 p.A444E + Nav1.5-β. (B) Relaciones densidad de corriente-voltaje medias construidas para corrientes registradas en células que expresaban canales Kir2.3 WT y mutante solo o más Nav1.5-β. En (B), los recuadros muestran los datos a potenciales positivos del  $E_K$  en escala expandida. En (B) \*  $P < 0.05$  frente a Kir2.3 p.A444E (ANOVA seguido de un test de Newman-Keuls y modelo multinivel de efectos mixtos). Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de más de 25 experimentos/células. (ANOVA seguido del test de Newman-Keuls y modelo multinivel de efectos mixtos).

En estudios previos se había demostrado que Kir2.1, Kir2.2 y Kir2.3 se unen a SAP97 con la misma afinidad (Leonoudakis y cols., 2001; 2004a; 2004b; Vikstrom y cols., 2009; Milstein y cols., 2012). Por el contrario, se ha descrito que los canales Kir2.3 se unen a la  $\alpha$ 1-sintrofina con menor afinidad que Kir2.2 (Leonoudakis y cols., 2004a). Teniendo en cuenta este hecho, nuestros resultados sugerirían que la modulación positiva Kir2.x-Nav1.5 no estaría mediada por la unión de estos canales a SAP97, si no a la  $\alpha$ 1-sintrofina. Para evaluar esta hipótesis, se substituyó la secuencia C-terminal (SEI) de los canales Kir2.1 y Kir2.2 por otra secuencia de unión a dominios PDZ (SSV) que permite la unión a la  $\alpha$ 1-sintrofina pero no a SAP97 (Leonoudakis y cols., 2001). Los resultados obtenidos demuestran que la substitución de la secuencia C-terminal, no produjo cambios significativos en las propiedades electrofisiológicas. Sin embargo, es importante destacar que la cotransfección de Nav1.5-β con el canal Kir2.1 SSV aumentó significativamente la corriente generada por el canal Kir2.1 SSV (Figura V.20), lo cual reforzaba la hipótesis de que es la  $\alpha$ 1-sintrofina, y no SAP97 la proteína de anclaje implicada en la modulación Kir2.x-Nav1.5.



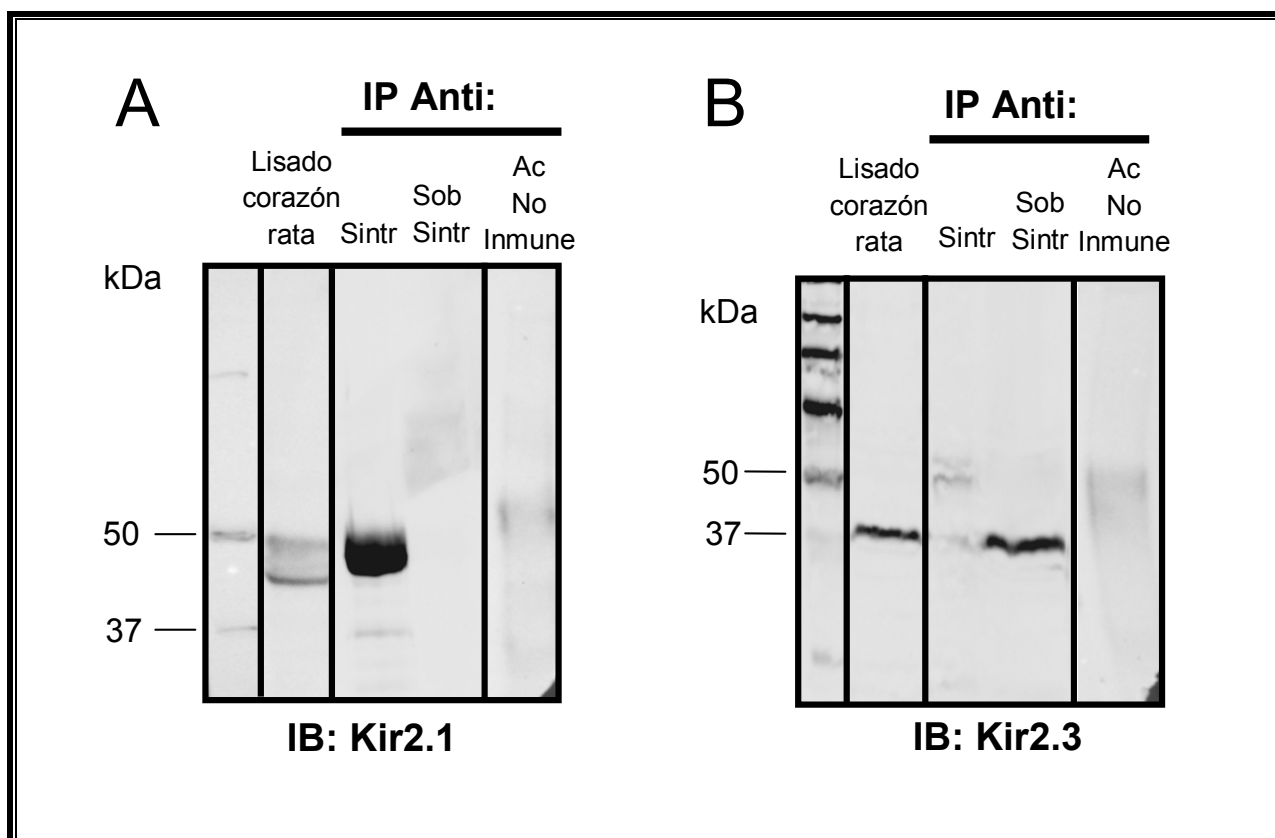
**Figura V.20.** El canal Nav1.5 aumenta la corriente generada por canales Kir2.1 con un dominio de unión a PDZ que permite la unión a la  $\alpha 1$ -sintrofina [Ser, Ser, Val (SSV)], pero no a SAP97. Relaciones densidad de corriente-voltaje medias construidas para corrientes registradas en células CHO que expresaban canales Kir2.1 WT y Kir2.1 SSV solos o conjuntamente con Nav1.5- $\beta$ . En el recuadro se muestran los datos a potenciales positivos del  $E_K$  en escala expandida. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de más de 25 experimentos/células. (ANOVA seguido del test de Newman-Keuls y modelo multinivel de efectos mixtos).

## 2.2. Papel de la $\alpha 1$ -sintrofina en la modulación Kir2.x-Nav1.5

### 2.2.1. Estudios de interacción entre los canales Kir2.x, Nav1.5 y la $\alpha 1$ -sintrofina

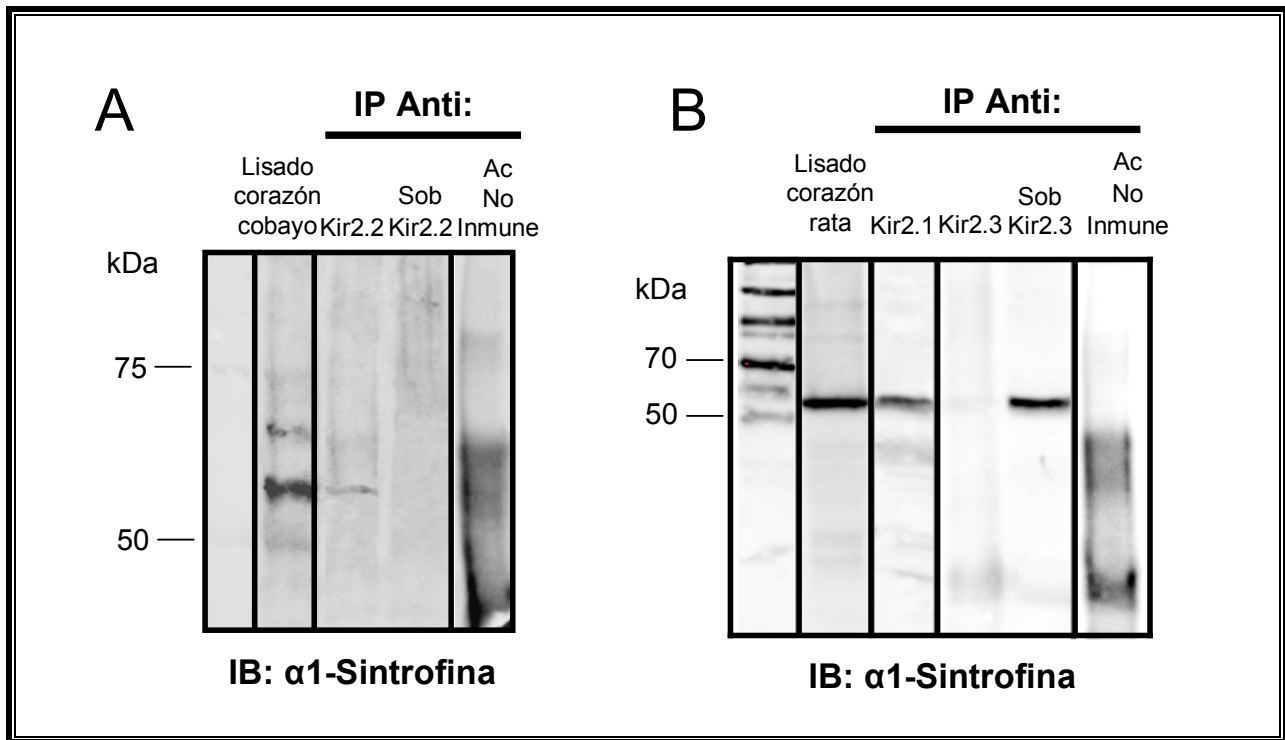
Para determinar si la  $\alpha 1$ -sintrofina era la proteína de anclaje implicada en la modulación Kir2.x-Nav1.5, realizamos un abordaje experimental que conllevó experimentos electrofisiológicos y de biología molecular en líneas celulares y en miocardio de rata. En primer lugar, se llevaron a cabo ensayos de co-inmunoprecipitación en miocardio ventricular de rata (Figura V.21A y B). Como se puede apreciar en la Figura V.21A los canales Kir2.1, que aparecen a un peso molecular cercano a 50 KDa en el lisado ventricular de rata (segundo carril), co-inmunoprecipitan con la  $\alpha 1$ -sintrofina (tercer carril), pero no aparecen en el sobrenadante de la co-inmunoprecipitación (cuarto carril), lo que demuestra que los canales Kir2.1 co-inmunoprecipitan con la  $\alpha 1$ -sintrofina. Por el contrario, en la Figura V.21B se observa que los canales Kir2.3, que aparecen a un peso molecular de 37 KDa

**Figura V.21. (Página siguiente).** Los canales Kir2.1, pero no Kir2.3, co-inmunoprecipitan con la  $\alpha 1$ -sintrofina. (A) y (B). Kir2.1 (A) pero no Kir2.3 (B) inmunoprecipita con  $\alpha 1$ -sintrofina. Kir2.1 y Kir2.3 fueron detectados por *western blot* en lisados de corazones de rata ( $N = 6$ ). En A y B, las reacciones de inmunoprecipitación utilizaban preparaciones enriquecidas de membrana. Se muestran los sobrenadantes (Sob) recuperados después de la centrifugación llevada a cabo los experimentos de inmunoprecipitación. Como control negativo, se utilizaron los lisados tratados con una IgG no específica (y Proteína A/G) (carril "Ac no inmune"). En todos los paneles los lisados y sus correspondientes co-inmunoprecipitaciones fueron cargadas en el mismo gel, los carriles fueron separados (líneas continuas) solo cuando se incubaron con un anticuerpo secundario con HRP para detectar los lisados (WB normal) o con proteína A conjugadas con HRP para detectar las co-inmunoprecipitaciones. IB, anticuerpo utilizado para el *immunoblotting*, IP, anticuerpo utilizado para la inmunoprecipitación.



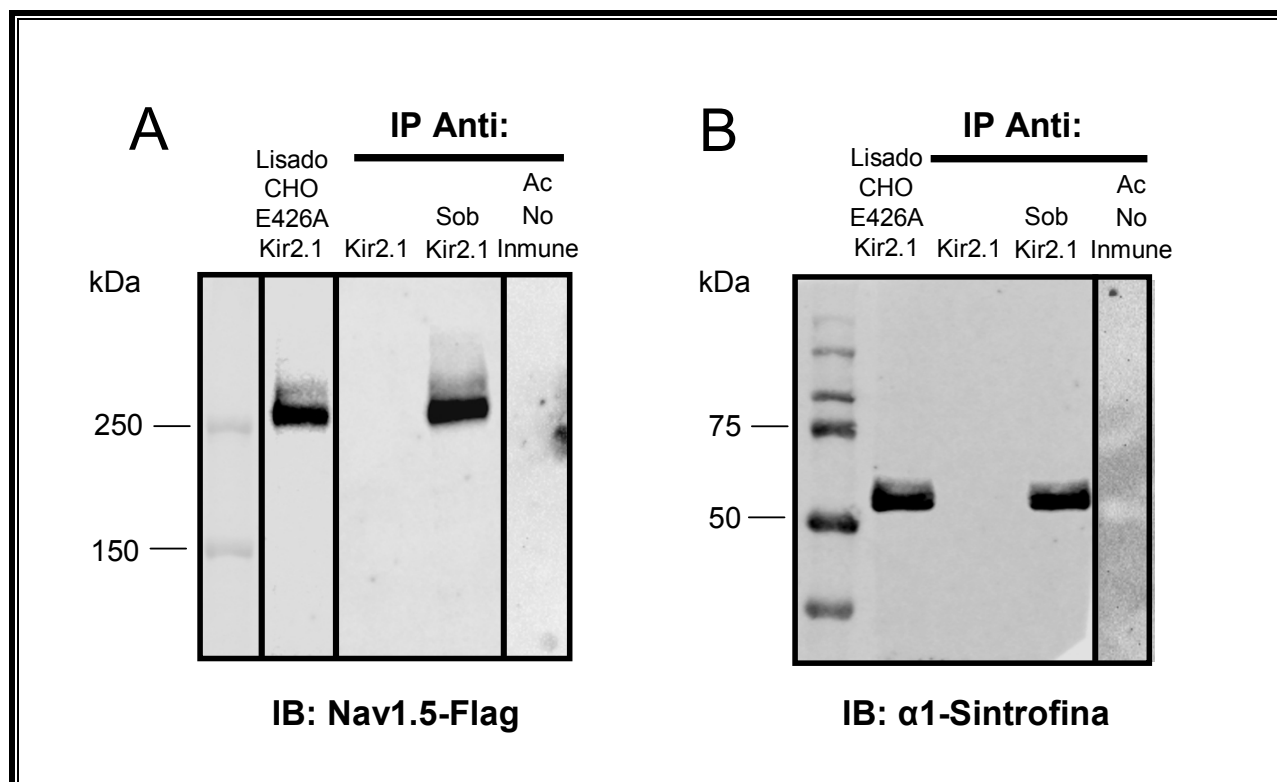
en el lisado ventricular de rata (segundo carril), no co-inmunoprecipitan con la  $\alpha 1$ -sintrofina (tercer carril), apareciendo en el sobrenadante de la co-inmunoprecipitación (cuarto carril).

Para reforzar la validez de los resultados obtenidos, realizamos la co-inmunoprecipitación a la inversa, es decir, se utilizó en primer lugar el anticuerpo frente al canal y a continuación se detectó la presencia en el inmunoprecipitado de la  $\alpha 1$ -sintrofina. Como se puede apreciar en la Figura V.22A la  $\alpha 1$ -sintrofina, que aparece a un peso molecular entre 50 y 75 KDa en el lisado ventricular de cobayo (segundo carril), co-inmunoprecipita con los canales Kir2.2 (tercer carril), no aparece banda correspondiente a esta proteína en el sobrenadante de la co-inmunoprecipitación (cuarto carril). Asimismo, en la Figura V.22B la  $\alpha 1$ -sintrofina, que aparece a un peso molecular entre 50 y 70 KDa en el lisado ventricular de rata (segundo carril), co-inmunoprecipita con Kir2.1 (tercer carril), pero no con Kir2.3 (cuarto carril), apareciendo en el sobrenadante de la co-inmunoprecipitación llevada a cabo con el anticuerpo de Kir2.3 (quinto carril).



**Figura V.22. La  $\alpha$ 1-sintrofina co-inmunoprecipita con los canales Kir2.1 y Kir2.2, pero no con Kir2.3.** (A) La  $\alpha$ 1-sintrofina inmunoprecipita con Kir2.2 ( $n = 3$ ). La  $\alpha$ 1-sintrofina fue detectada por *western blot* en lisados de corazones de cobayo ( $N = 3$ ). (B) La  $\alpha$ 1-sintrofina inmunoprecipita con Kir2.1 pero no con Kir2.3 ( $n = 3$ ). La  $\alpha$ 1-sintrofina fue detectada por *western blot* en lisados de corazones de rata ( $N = 3$ ). En A y B, las reacciones de inmunoprecipitación utilizaban preparaciones enriquecidas de membrana. También se muestran los sobrenadantes (Sob) recuperados después de la centrifugación en los experimentos de inmunoprecipitación. Como control negativo, se utilizaron los lisados tratados con una IgG no específica (y Proteína A/G) (carril “Ac no inmune”). En todos los paneles, los lisados y sus correspondientes co-inmunoprecipitaciones fueron cargadas en el mismo gel, los carriles fueron separados (líneas continuas) sólo cuando se incubaron con un anticuerpo secundario diferente: en este caso se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con HRP para detectar los lisados (WB normal) o con proteína A conjugadas con HRP para detectar las co-inmunoprecipitaciones. IB, anticuerpo utilizado para el *immunoblotting*, IP, anticuerpo utilizado para la inmunoprecipitación.

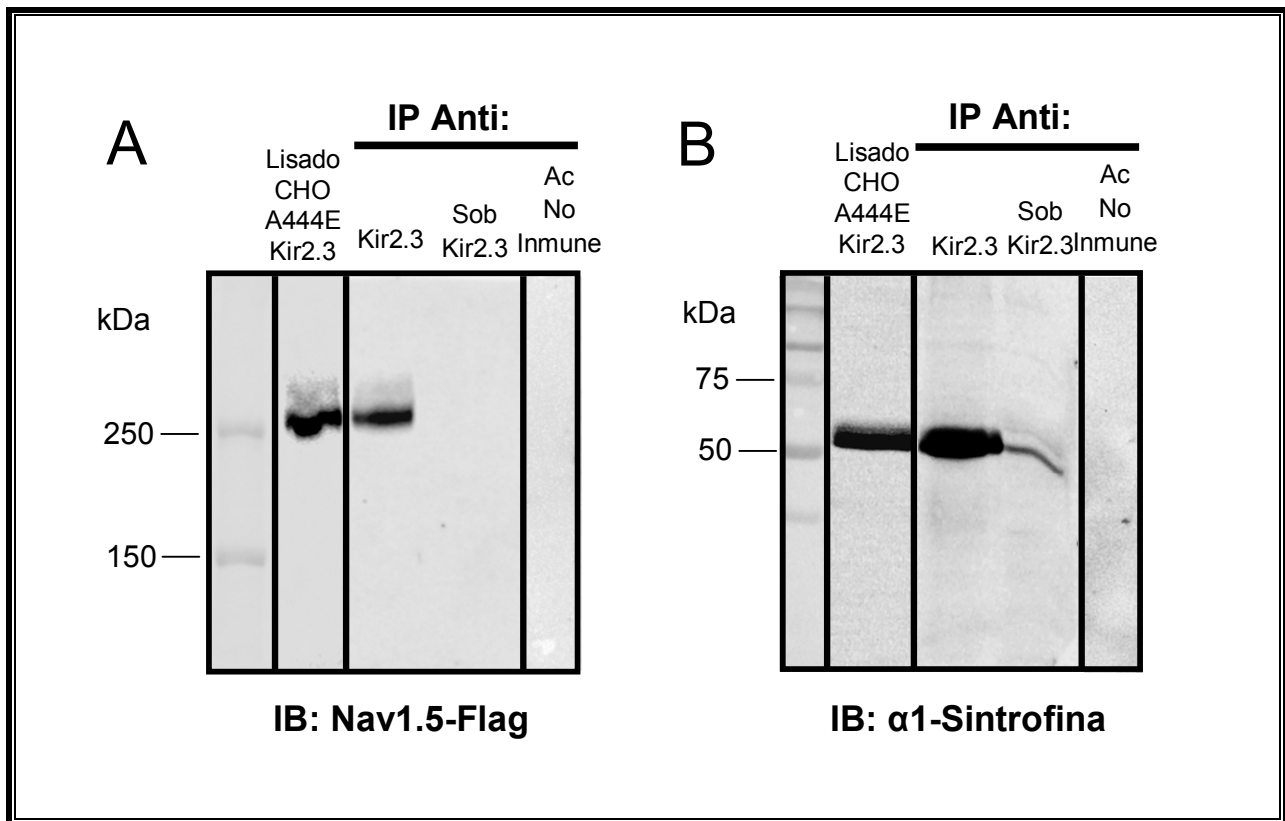
Para confirmar que la presencia o ausencia del ácido glutámico en p1 determinaba la interacción de los canales Kir2.x con los canales Nav1.5 y con la  $\alpha$ 1-sintrofina, se realizaron estudios de co-inmunoprecipitación en células CHO. Es importante destacar que esta línea celular expresa de forma endógena la  $\alpha$ 1-sintrofina, por lo que constituyen un modelo idóneo para este grupo de experimentos. Se emplearon células CHO transfectadas con los plásmidos que codificaban para los canales Kir2.1 p.E426A, Kir2.3 p.A444E y Nav1.5-Flag (canal Nav1.5 que incluye una secuencia “Flag”, DYKDDDDK, que permite su detección mediante *western blot* utilizando un anticuerpo que reconoce la secuencia Flag). Como se puede observar en la Figura V.23A los canales Nav1.5-Flag, que aparecen a un peso molecular de 250 KDa en el lisado de células CHO (segundo carril), no co-inmunoprecipitan con los canales Kir2.1 p.E426A (tercer carril). Sin embargo, aparece una banda



**Figura V.23. Interacciones proteína – proteína entre Kir2.1 E426A, Nav1.5 y  $\alpha$ 1-sintrofina en células CHO.** (A) Los canales Nav1.5-Flag no inmunoprecipitan con Kir2.1 E426A. (B) La  $\alpha$ 1-sintrofina no inmunoprecipita con los canales Kir2.1 E426A. Nav1.5-Flag y  $\alpha$ 1-sintrofina fueron detectados por *western blot* en lisados de células CHO ( $n = 4$ , placas diferentes). En A y B, las reacciones de inmunoprecipitación utilizaban preparaciones enriquecidas de membrana. También se muestran los sobrenadantes (Sob) recuperados después de la centrifugación de realizada en los experimentos de inmunoprecipitación. Como control negativo, se utilizaron los lisados tratados con una IgG no específica (y Proteína A/G) (carril “Ac no inmune”). En todos los paneles excepto en B, los lisados y sus correspondientes co-inmunoprecipitaciones fueron cargadas en el mismo gel; los carriles fueron separados (líneas continuas) sólo cuando se incubaron con un anticuerpo secundario con HRP para detectar los lisados (WB normal) o con proteína A conjugadas con HRP para detectar las co-inmunoprecipitaciones. IB, anticuerpo utilizado para el *immunoblotting*, IP, anticuerpo utilizado para la inmunoprecipitación.

correspondiente al Nav1.5-Flag en el sobrenadante de la co-inmunoprecipitación (cuarto carril). Asimismo, en la Figura V.23B la  $\alpha$ 1-sintrofina, que aparece a un peso molecular de entre 50 y 75 KDa en el lisado de células CHO (segundo carril), no co-inmunoprecipita con Kir2.1 p.E426A (tercer carril), apareciendo este canal mutante en el sobrenadante de la co-inmunoprecipitación (cuarto carril).

A continuación, quisimos determinar si la incorporación del ácido glutámico en posición p1 del extremo C-terminal de Kir2.3, favorecía su interacción con el canal Nav1.5 y con la  $\alpha$ 1-sintrofina. Como se puede apreciar en la Figura V.24A los canales Nav1.5- Flag, que aparecen a un peso



**Figura V.24. Interacciones proteína – proteína entre Kir2.3 p.E444E, Nav1.5 y  $\alpha$ -1-sintrofina en células CHO.** (A) Los canales Nav1.5-Flag inmunoprecipitan con Kir2.3 p.A444E. (B)  $\alpha$ -1-sintrofina inmunoprecipita con los canales Kir2.3 p.A444E. Nav1.5-Flag y  $\alpha$ -1-sintrofina fueron detectados por *western blot* en lisados de células CHO (n = 4, placas diferentes). En A y B, las reacciones de inmunoprecipitación utilizaban preparaciones enriquecidas de membrana. Se muestran los sobrenadantes (Sob) recuperados después de la centrifugación en los experimentos de inmunoprecipitación. Como control negativo, se utilizaron los lisados tratados con una IgG no específica (y Proteína A/G) (carril “Ac no immune”). En todos los paneles los lisados y sus correspondientes co-inmunoprecipitaciones fueron corridas en el mismo gel, los carriles fueron separados (líneas continuas) solo cuando se incubaron con un anticuerpo secundario con HRP para detectar los lisados (WB normal) o con proteína A conjugadas con HRP para detectar las co-inmunoprecipitaciones. IB, anticuerpo utilizado para el *immunoblotting*, IP, anticuerpo utilizado para la inmunoprecipitación.

molecular de 250 KDa en el lisado de células CHO (segundo carril), co-inmunoprecipitan con los canales Kir2.3 p.A444E (tercer carril), no observándose banda correspondiente al Nav1.5-Flag en el sobrenadante de la co-inmunoprecipitación (cuarto carril). Asimismo, en la Figura V.24B la  $\alpha$ -1-sintrofina, que aparece a un peso molecular de entre 50 y 75 KDa en el lisado de células CHO (segundo carril), co-inmunoprecipita con Kir2.3 p.A444E (tercer carril), apareciendo este canal mutante mínimamente en el sobrenadante de la co-inmunoprecipitación (cuarto carril).

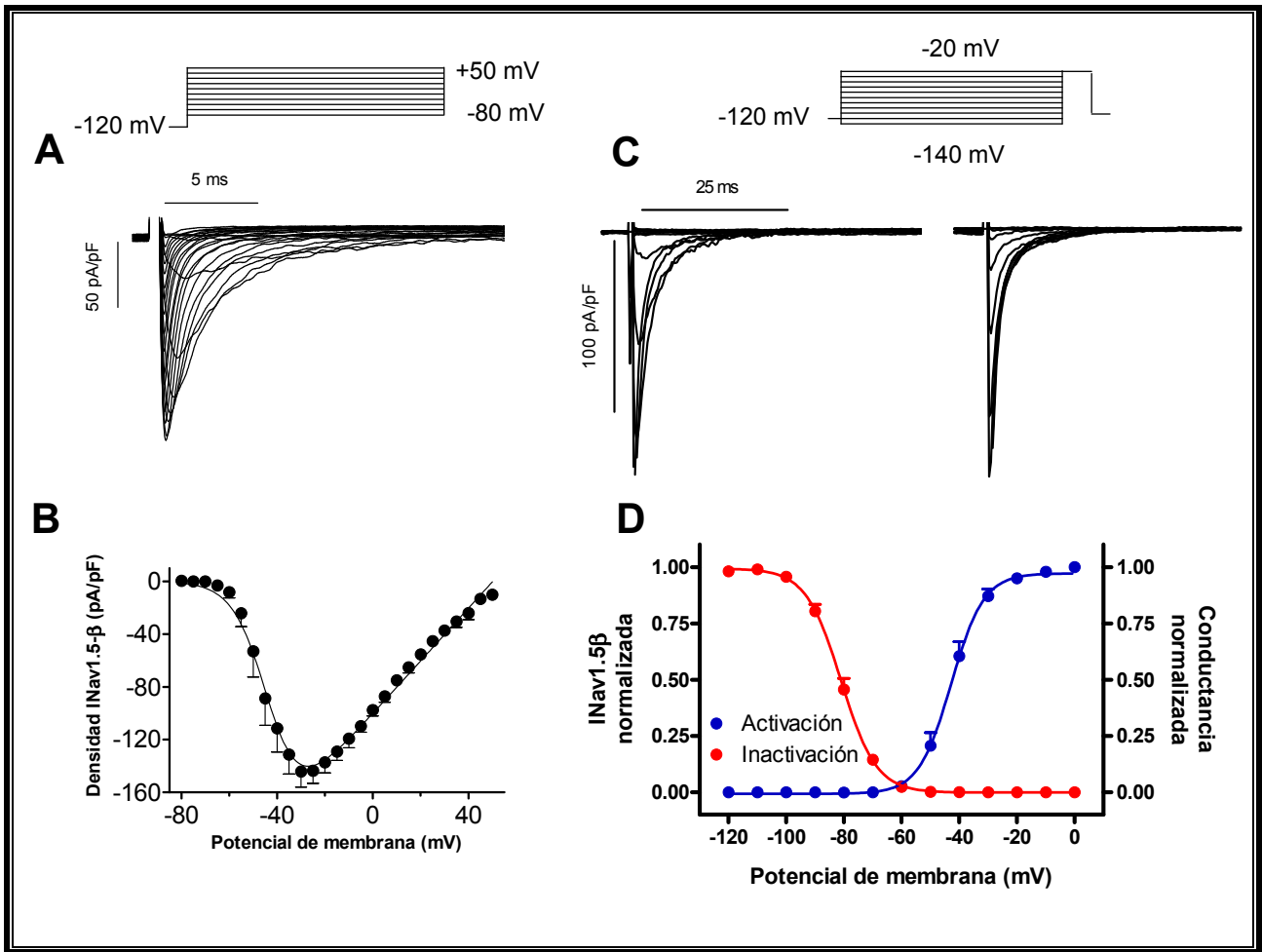
Estos resultados demuestran que la presencia del ácido glutámico en posición p1 del extremo C-terminal de los canales Kir2.x es indispensable para su interacción con los canales Nav1.5 y con la  $\alpha$ -1-sintrofina. Eso justificaría el hecho de que los canales Nav1.5 puedan modular positivamente las corrientes generadas por los canales Kir2.1 y Kir2.2, pero no las generadas por Kir2.3.

### 3. PAPEL DE LAS PROTEÍNAS DE ANCLAJE $\alpha$ 1-SINTROFINA Y SAP97 EN LA MODULACIÓN RECÍPROCA POSITIVA

Para analizar el papel de la  $\alpha$ 1-sintrofina y SAP97 en la modulación positiva de las corrientes generadas por los canales Nav1.5 y Kir2.x, se redujo la expresión de  $\alpha$ 1-sintrofina y SAP97 en células CHO, y de  $\alpha$ 1-sintrofina en miocitos ventriculares de rata adulta utilizando siRNAs o shRNAs, respectivamente.

#### 3.1. Características electrofisiológicas de la $I_{Nav1.5-\beta}$

La cotransfección transitoria en células CHO de los ADNc que codifican la expresión de los canales Nav1.5 (SCN5A) (1.6  $\mu$ g) y la subunidad auxiliar  $\beta$ 1 (SCN1B) (1.6  $\mu$ g), permitió el registro de la  $I_{Nav1.5-\beta}$  mediante la técnica de *patch-clamp*. Las principales características electrofisiológicas de la  $I_{Nav1.5-\beta}$  registrada, que se muestran en la Figura V.25, coinciden con las descritas originalmente para esta corriente iónica (Cribbs y cols., 1990; White y cols., 1991; Gellens y cols., 1992; Qu y cols., 1994; O'Leary y Horn, 1994). En la Figura V.25A se muestra una familia de trazos de corriente obtenidos en una célula CHO transfectada de forma transitoria con los ADNc que codifican la expresión del canal Nav1.5 y la subunidad  $\beta$ 1. Los trazos de  $I_{Nav1.5-\beta}$  fueron registrados al aplicar pulsos de 50 ms de duración desde -80 mV hasta +50 mV en incrementos de 5 mV (potencial de fijación = -120 mV). Tras la aplicación del pulso despolarizante, la  $I_{Nav1.5-\beta}$  alcanzaba rápidamente un pico máximo de corriente ( $\tau_{act} = 0.2 \pm 0.03$  ms), que disminuía también de forma rápida hasta suprimirse casi completamente como consecuencia del paso del canal a su estado inactivo ( $\tau_{inact\ rápida} = 0.8 \pm 0.004$  ms;  $\tau_{inact\ lenta} = 5.2 \pm 0.2$  ms) (Figura V.25A). En el panel B de la Figura V.25, se muestra la relación densidad de corriente-voltaje con la morfología de campana invertida característica de los canales Nav1.5 obtenida al representar la densidad de la corriente medida como la diferencia entre el pico máximo y el final de cada pulso (50 ms) en función del voltaje aplicado. A potenciales entre -80 y -65 mV, no se registraban corrientes de Na voltaje-dependientes. A potenciales más positivos de -60 mV, la corriente aumentaba hasta alcanzar el máximo aproximadamente a -30 mV ( $-144.3 \pm 11.9$  pA/pF) ( $n = 25$ ). A potenciales más positivos, la amplitud de la corriente disminuía progresivamente como consecuencia de la inactivación voltaje-dependiente del canal. El ajuste de la ecuación IV.1 (Material y Métodos) a los datos experimentales permitió calcular el potencial de inversión que resultó ser de  $50.1 \pm 1.2$  mV ( $n = 25$ ). En el panel D de la Figura V.25 se muestran las curvas de activación (azul) e inactivación



**Figura V.25. Características electrofisiológicas de la  $I_{Nav1.5-\beta}$ .** (A) Familia de trazos de la  $I_{Nav1.5-\beta}$  registrada en células CHO tras aplicar el protocolo que se muestra en la parte superior de la figura. (B) Relación densidad de corriente-voltaje para la  $I_{Nav1.5-\beta}$ . (C) Familia de trazos de la  $I_{Nav1.5-\beta}$  registrados tras la aplicación del protocolo de doble pulso que se muestra en la parte superior de la figura. (D) Curvas de activación (azul) e inactivación (rojo) de  $Nav1.5-\beta$ . En (B) y (D), cada punto representa la media  $\pm$  EEM de 25 células/experimentos.

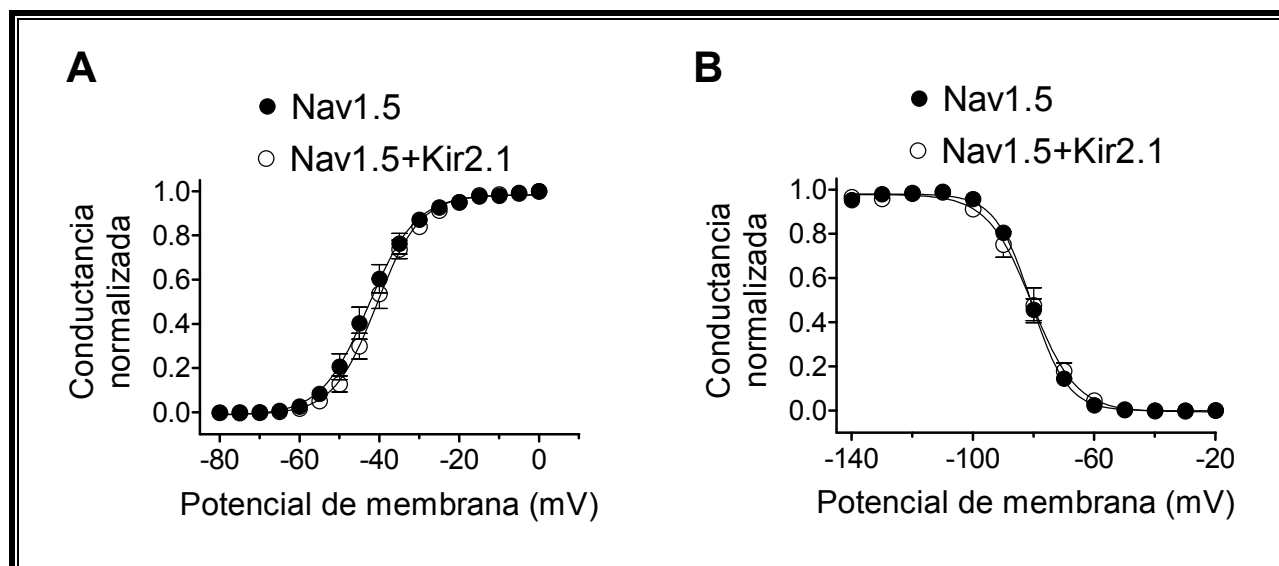
(rojo) de  $Nav1.5$ . La curva de activación representa la dependencia de voltaje de la transición desde el estado cerrado al estado abierto y se construyó representando el valor de conductancia normalizado en función del potencial de membrana. La conductancia a cada potencial de membrana se calculó utilizando la ecuación IV.2. Por otra parte, la curva de inactivación que representa la dependencia de voltaje de la transición del estado abierto al inactivo, se construyó mediante el protocolo de doble pulso que se muestra en la Figura V.25C. Primero se aplicaba un pulso de 500 ms de duración desde -140 mV hasta -20 mV en incrementos de 10 mV (potencial de fijación -120 mV), seguido de un pulso test a -20 mV.

Las curvas de inactivación se construyeron representando la amplitud de corriente registrada mediante el pulso test normalizada al pico de corriente máxima en función del voltaje aplicado en

cada pulso. El ajuste de una ecuación de Boltzmann tanto a las curvas de activación como a las de inactivación permitió obtener los valores del punto medio ( $V_h$ ) ( $V_{h_{act}} = -42.8 \pm 0.07$  mV,  $V_{h_{inact}} = -81 \pm 0.04$  mV) y de la pendiente ( $k$ ) ( $k_{act} = 5.7 \pm 0.06$ ,  $k_{inact} = -6.1 \pm 0.03$ ) de cada curva.

En el siguiente grupo de experimentos, se comprobó como al cotransfectar en células CHO Nav1.5- $\beta$  (1.6  $\mu$ g) junto con los canales Kir2.1 (1.6  $\mu$ g) el pico máximo de densidad de corriente de la  $I_{Nav1.5-\beta}$  ( $249.8 \pm 21.4$  pA/pF) era significativamente mayor que el registrado al transfectar con Nav1.5- $\beta$  solo ( $157.4 \pm 9.9$  pA/pF), tal y como ya había sido demostrado en miocitos ventriculares de rata (Milstein y cols., 2012). Para descartar que la sobreexpresión de los canales Kir2.1 afectara de alguna manera a las curvas de activación o inactivación de Nav1.5, se realizaron experimentos de electrofisiología dónde, como se puede apreciar en la Figura V.26, no se veía modificada ni la dependencia de voltaje de la activación (A) ni de la inactivación (B) de Nav1.5 debido a la sobreexpresión de Kir2.1.

Estos resultados confirmaban que el aumento de la  $I_{Nav1.5}$  producido por Kir2.1 no era consecuencia de un efecto sobre la dependencia de voltaje de las transiciones del canal, tal y como ya se había demostrado previamente (Milstein y cols., 2012).

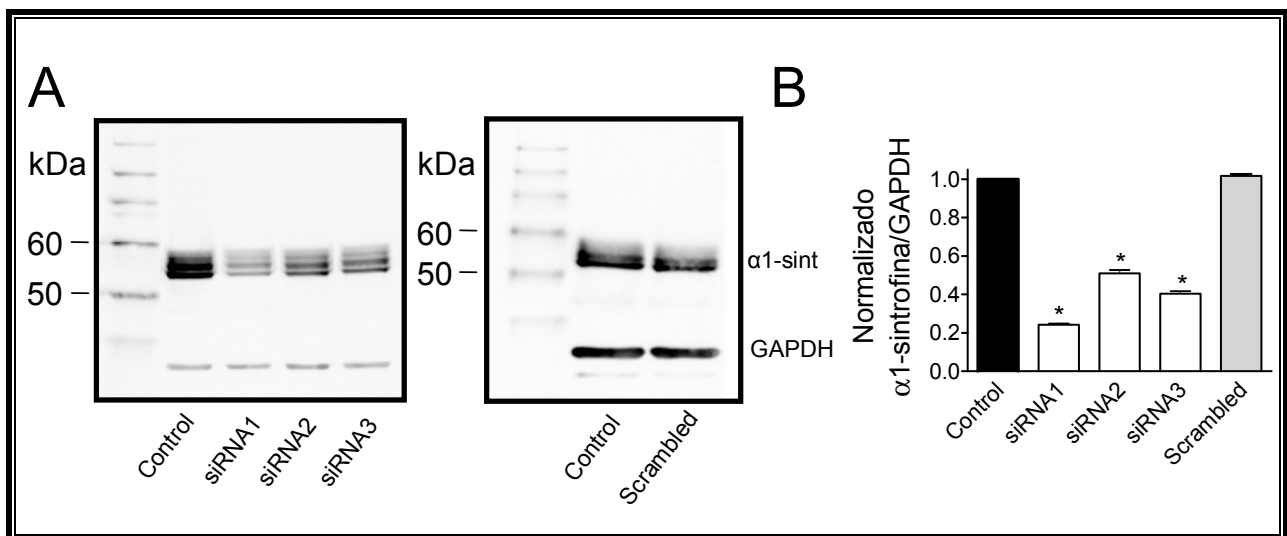


**Figura V.26.** Las curvas de activación y de inactivación de la  $I_{Nav1.5}$  no se modifican en presencia de canales Kir2.1. Curvas conductancia-voltaje (A) y curvas de inactivación de  $I_{Nav1.5}$  (B) obtenidas en células CHO cotransfectadas o no con canales Kir2.1. En A y B, cada punto representa la media  $\pm$  EEM de  $> 6$  experimentos/células en cada grupo. Se realizó ANOVA de una vía seguido del test de Newman-Keuls y un modelo multinivel de efectos mixtos.

### 3.2. Efectos del silenciamiento de SAP97 y $\alpha 1$ -sintrofina sobre la modulación de $I_{Kir2.1}$ e $I_{Nav1.5}$

#### 3.2.1. Silenciamiento de $\alpha 1$ -sintrofina en células CHO

Para determinar si la  $\alpha 1$ -sintrofina juega un papel en la modulación recíproca positiva entre canales Kir2.1 y Nav1.5, registramos la  $I_{Kir2.1}$  y la  $I_{Nav1.5}$  en células CHO en las que se había silenciado la  $\alpha 1$ -sintrofina utilizando siRNAs específicos. En experimentos previos, demostramos que la expresión de  $\alpha 1$ -sintrofina se redujo significativamente en células CHO a las 24 horas de haber sido transfectadas con siRNAs específicos de *Cricetulus griseus* para  $\alpha 1$ -sintrofina (50 nM) (Figura V.27A y 27B). Como se puede apreciar en la imagen mostrada en la parte izquierda de la Figura V.27A, en el segundo carril aparecen unas bandas entre 50 y 60 KDa correspondientes a la



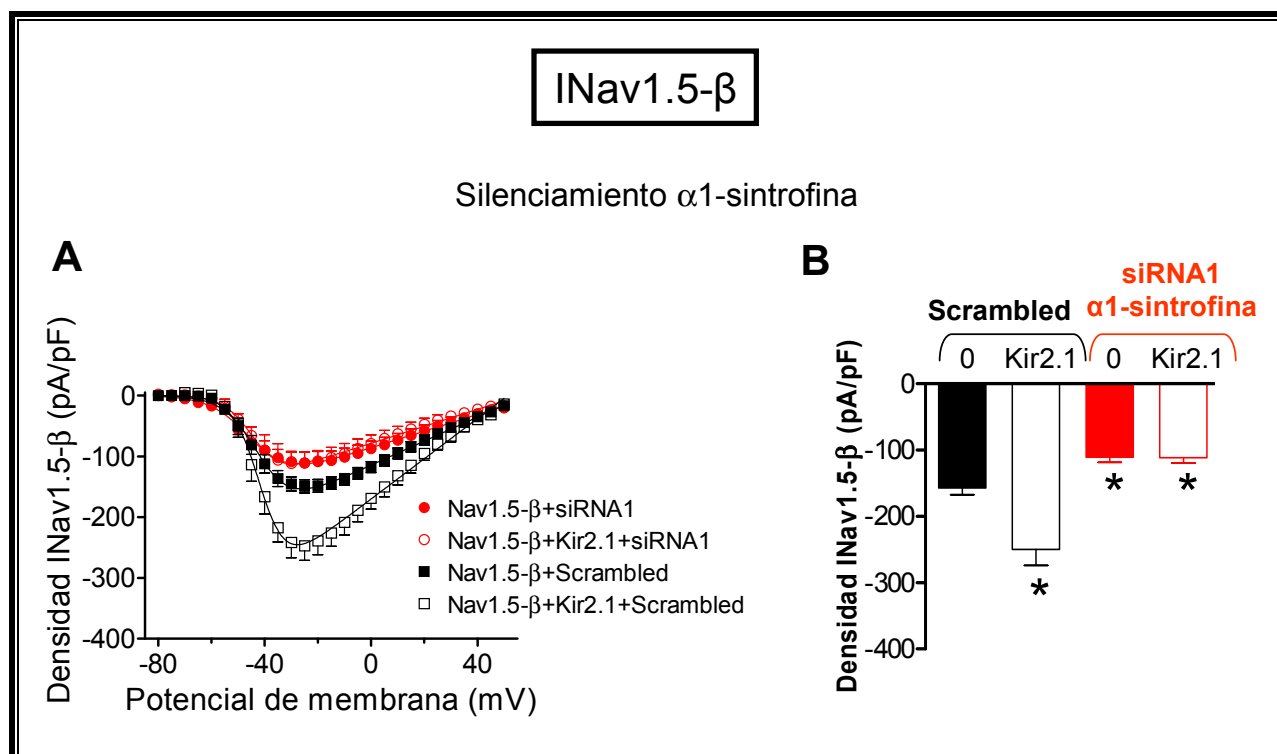
**Figura V.27. Silenciamiento de  $\alpha 1$ -sintrofina utilizando siRNAs en células CHO.** (A) *Immunoblot* de  $\alpha 1$ -sintrofina obtenido en células CHO transfectadas con tres siRNAs específicos de  $\alpha 1$ -sintrofina o con un siRNA control negativo (*scrambled*), todos ellos a una concentración de 50 nM. La proteína GAPDH fue utilizada como control de carga. (B) Expresión de  $\alpha 1$ -sintrofina normalizada a la de GAPDH medida por *western blot* en células CHO transfectadas o no con siRNAs de  $\alpha 1$ -sintrofina o con siRNA *scrambled* (control). En B, los resultados están expresados como la media  $\pm$  EEM de 4 placas en cada grupo. Se realizó ANOVA de una vía seguido de un test de Newman-Keuls y un modelo multinivel de efectos mixtos. En B, \* $P < 0.05$  frente a células transfectadas con siRNA *scrambled*.

$\alpha 1$ -sintrofina procedente del lisado de células control (sin transfectar). En la misma imagen se aprecia como la transfección con 3 siRNAs diferentes para  $\alpha 1$ -sintrofina redujo la intensidad de la banda correspondiente a la  $\alpha 1$ -sintrofina, particularmente con siRNA1 (75.8 % de reducción). Además, en la parte derecha de la figura se puede apreciar que el efecto era específico de los siRNAs utilizados, ya que un siRNA cuya secuencia es aleatoria y sirve como control (*scrambled*) no cambió significativamente la expresión de la  $\alpha 1$ -sintrofina. Teniendo en cuenta estos resultados

seleccionamos el siRNA1 para silenciar  $\alpha$ 1-sintrofina en los experimentos de electrofisiología realizados a continuación.

### 3.2.1.1. Efectos del silenciamiento de $\alpha$ 1-sintrofina sobre la $I_{Nav1.5-\beta}$ en células CHO

En este grupo de experimentos se determinó el efecto del silenciamiento de la  $\alpha$ 1-sintrofina sobre la modulación positiva de la  $I_{Nav1.5-\beta}$  por parte de los canales Kir2.1 en células CHO. Como



**Figura V.28. Efectos del silenciamiento de  $\alpha$ 1-sintrofina sobre  $I_{Nav1.5-\beta}$  en células CHO.** (A) Relaciones densidad de corriente-voltaje medias para  $I_{Nav1.5-\beta}$  registradas en células CHO en las que la  $\alpha$ 1-sintrofina fue silenciada (siRNA1) o no (*scrambled*) y transfectadas con canales Nav1.5- $\beta$  o Nav1.5- $\beta$  + Kir2.1. Para que se observen con mayor claridad las diferencias entre la densidad de la corriente en los distintos grupos experimentales, los símbolos que indican las diferencias estadísticamente significativas fueron omitidos. (B) Densidad máxima de  $I_{Nav1.5-\beta}$  registrada en células CHO en las que fue silenciada o no (*scrambled*) la  $\alpha$ 1-sintrofina y transfectadas con los canales Nav1.5- $\beta$  o Nav1.5- $\beta$  + Kir2.1. \*  $P < 0.05$  frente a  $I_{Nav1.5-\beta}$  en células transfectadas con siRNA *scrambled*. Cada barra representa la media  $\pm$  EEM de más de 12 experimentos/células. (ANOVA seguido de un test de Newman-Keuls y un modelo multinivel de efectos mixtos).

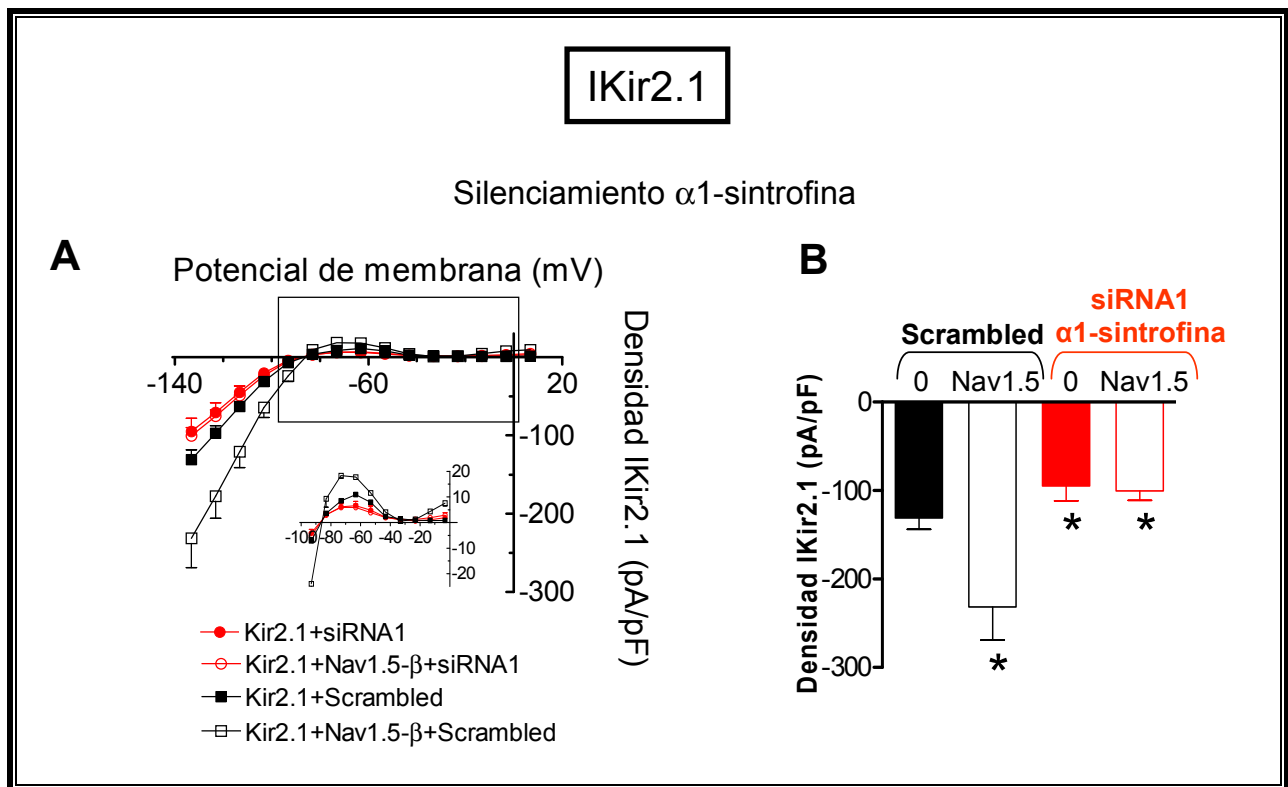
puede observarse en la Figura V.28A, la densidad de la  $I_{Nav1.5-\beta}$  ( $n = 21$ ,  $P < 0.05$ ) era significativamente menor en las células con la  $\alpha$ 1-sintrofina silenciada respecto a las células transfectadas con el siRNA *scrambled*. En presencia de siRNA *scrambled*, la cotransfección de Kir2.1 con Nav1.5- $\beta$  aumentó significativamente la densidad de la  $I_{Nav1.5-\beta}$  (Figura V.28A y B) de forma similar a lo observado en ausencia de siRNA *scrambled*. Por el contrario, en células transfectadas con siRNA1 la cotransfección de Nav1.5- $\beta$  con los canales Kir2.1 no incrementaba la

## Resultados

densidad de  $I_{Nav1.5-\beta}$ , lo que demostraba que al silenciar la expresión de la  $\alpha 1$ -sintrofina, se abolía la modulación positiva.

### 3.2.1.2. Efectos del silenciamiento de $\alpha 1$ -sintrofina sobre la $I_{Kir2.1}$ en células CHO

En el siguiente grupo de experimentos se determinó el efecto del silenciamiento de la  $\alpha 1$ -sintrofina sobre la modulación positiva de la  $I_{Kir2.1}$  por parte de los canales Nav1.5 en células CHO. Como se puede observar en la Figura V.29A, la densidad de la  $I_{Kir2.1}$  ( $n = 21$ ,  $P < 0.05$ ) fue significativamente menor en células con la  $\alpha 1$ -sintrofina silenciada respecto a las células transfectadas con el siRNA *scrambled*. Asimismo, se observa que en las células transfectadas con el siRNA *scrambled* la cotransfección con canales Nav1.5- $\beta$  aumentó la densidad de la  $I_{Kir2.1}$  que en



**Figura V.29. Efectos del silenciamiento de  $\alpha 1$ -sintrofina sobre la  $I_{Kir2.1}$  en células CHO.** (A) Relaciones densidad de corriente-voltaje medias para la  $I_{Kir2.1}$  registradas en células CHO en las que la  $\alpha 1$ -sintrofina fue silenciada (siRNA1) o no (*scrambled*) y transfectadas con canales Kir2.1 o Nav1.5- $\beta$  + Kir2.1. Para que se observen con mayor claridad las diferencias entre la densidad de la corriente en los distintos grupos experimentales, los símbolos que indican las diferencias estadísticamente significativas fueron omitidos. (B) Densidad de la  $I_{Kir2.1}$  a -120 mV registrada en células CHO en las que la  $\alpha 1$ -sintrofina fue silenciada o no (*scrambled*) y transfectadas con canales Kir2.1 o Kir2.1 + Nav1.5- $\beta$ . \*  $P < 0.05$  frente a  $I_{Nav1.5-\beta}$  en células transfectadas con siRNA *scrambled*. Cada barra representa la media  $\pm$  EEM de más de 12 experimentos/células. (ANOVA seguido de un test de Newman-Keuls y un modelo multinivel de efectos mixtos).

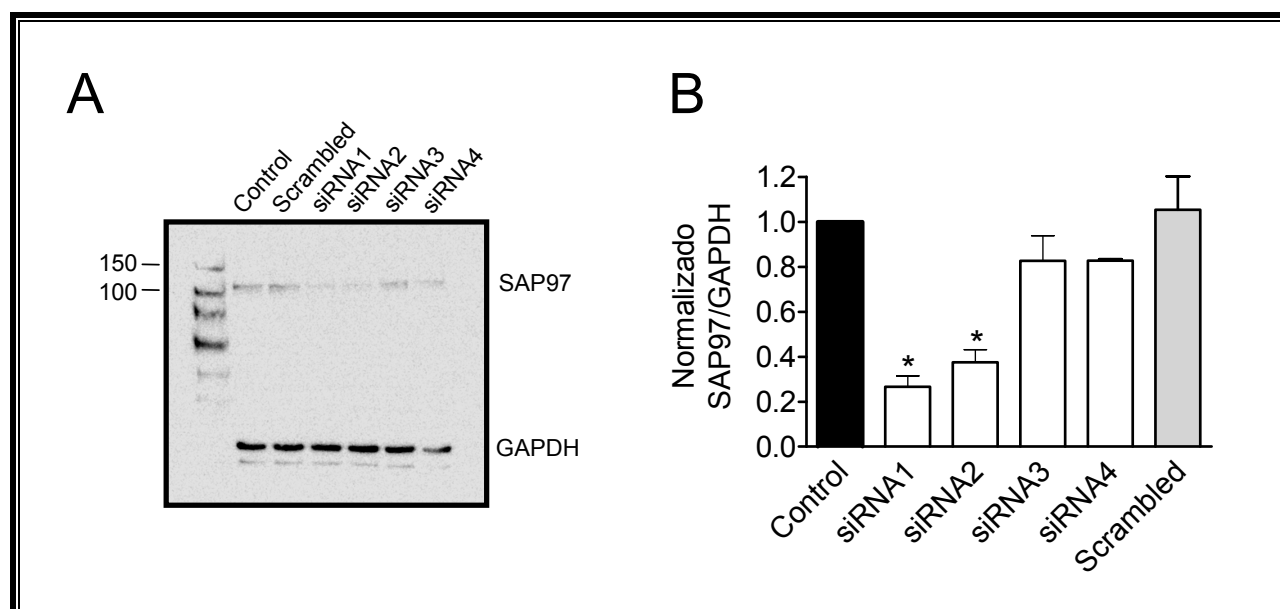
las células con  $\alpha 1$ -sintrofina silenciada, la cotransfección con canales Nav1.5- $\beta$  no incrementaba la densidad de  $I_{Kir2.1}$  a ninguno de los potenciales estudiados (Figura V.29A y B).

Por tanto estos resultados demostraban que el silenciamiento de la  $\alpha 1$ -sintrofina reducía la expresión de los canales Nav1.5 y Kir2.1 y, lo que es más importante, eliminaba la modulación recíproca positiva entre ambos.

### 3.2.2. Silenciamiento de SAP97 en células CHO

En el siguiente grupo de experimentos, se determinó la implicación de SAP97 en la modulación recíproca positiva entre Nav1.5 y Kir2.1. Para ello se utilizaron siRNA específicos de *Cricetulus griseus* para SAP97 (50 nM).

Como se puede apreciar en la imagen de la Figura V.30A, aparece en el segundo carril una banda entre 100 y 150 KDa correspondiente a SAP97 procedente del lisado de células control (sin transfectar). En la misma imagen se muestra la expresión de SAP97 en células transfectadas con 4 siRNAs diferentes. Como se puede observar, la expresión de SAP97 disminuyó significativamente en presencia de siRNA1 y siRNA2 (Figura V.30A y B). Por tanto, se seleccionó el siRNA1 para silenciar SAP97 en los experimentos electrofisiológicos que se realizaron a continuación.

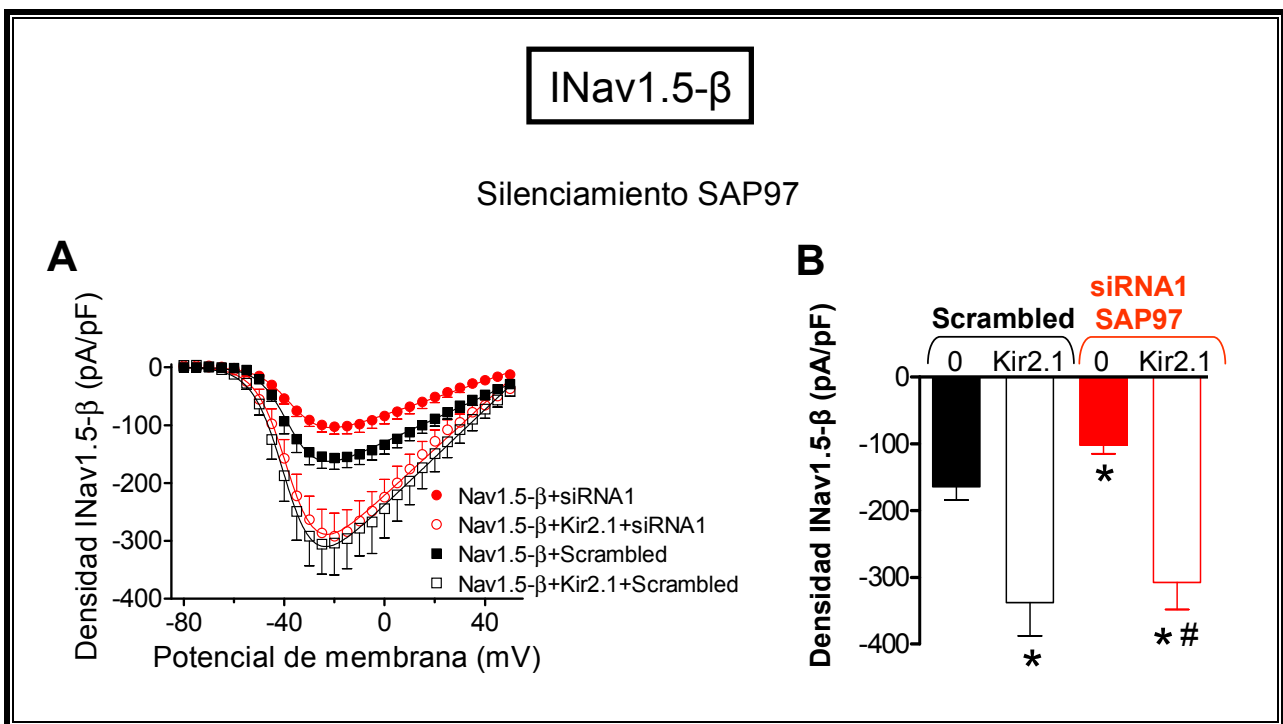


**Figura V.30. Silenciamiento de SAP97 utilizando siRNAs en células CHO.** (A) *Inmunoblot* de SAP97 obtenido en células CHO transfectadas con cuatro siRNAs específicos de SAP97 o con un siRNA control negativo (*Scrambled*). (B) Expresión de SAP97 normalizada a GAPDH medida por *western blot* en células CHO transfectadas o no con siRNAs específicos de SAP97 o siRNA *scrambled*. En B, los resultados están expresados como media  $\pm$  EEM de 4 placas en cada grupo. En B, \* $P < 0.05$  frente a células transfectadas con siRNA *scrambled*. (ANOVA de una vía seguido de un test de Newman-Keuls y un modelo multinivel de efectos mixtos).

3.2.2.1. Efectos del silenciamiento de SAP97 sobre la  $I_{Nav1.5-\beta}$  en células CHO

Como se puede observar en la Figura V.31, la densidad de la  $I_{Nav1.5-\beta}$  ( $n = 35$ ,  $P < 0.05$ ) era significativamente menor en las células con SAP97 silenciado respecto a las células transfectadas con el siRNA *scrambled* (Figura V.31). Dichos resultados demuestran que SAP97 juega un papel en la expresión de los canales Nav1.5 en la membrana plasmática, de tal forma que en ausencia de SAP97, la densidad de la corriente es menor.

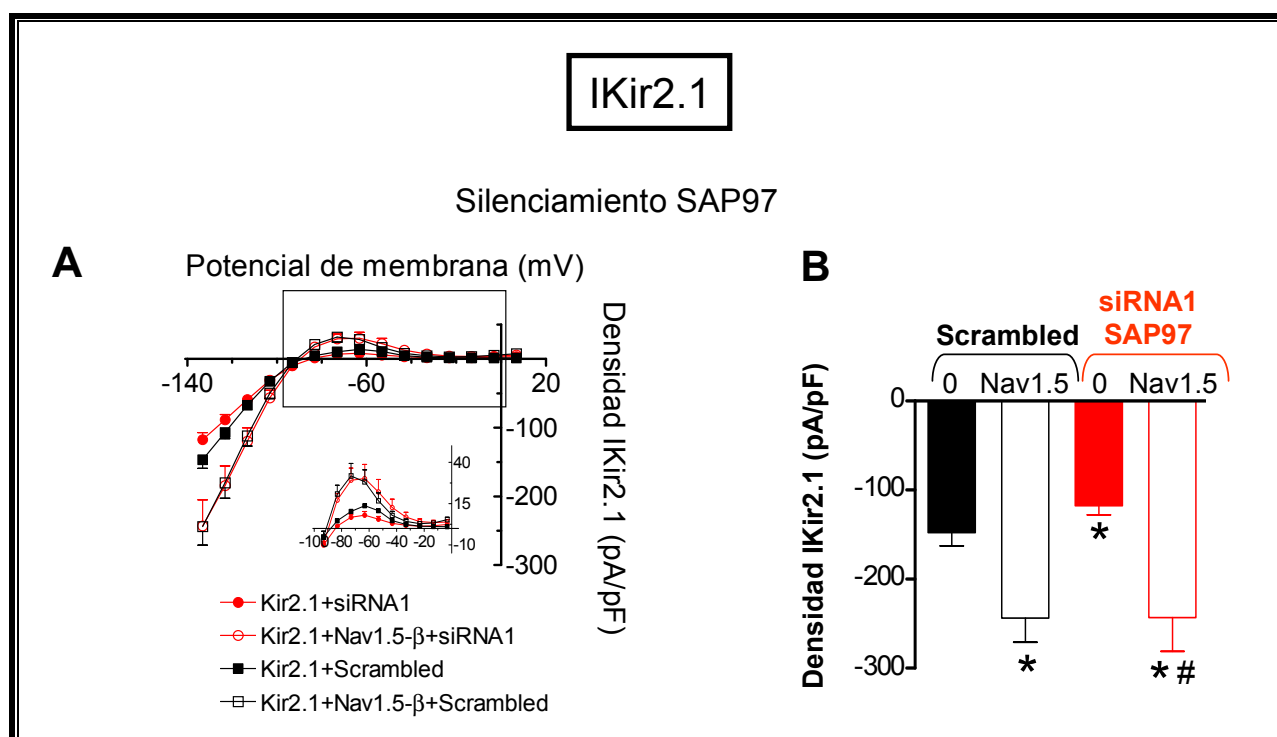
Sin embargo, es importante destacar que la cotransfección de Kir2.1 aumentó significativamente la densidad de la  $I_{Nav1.5-\beta}$  tanto en células cotransfectadas con el siRNA1 como con el siRNA *scrambled*. Estos resultados demostraban que SAP97 no participaba en la modulación recíproca positiva Nav1.5-Kir2.1.



**Figura V.31. Efectos del silenciamiento de SAP97 sobre  $I_{Nav1.5-\beta}$  en células CHO.** (A) Relaciones densidad de corriente-voltaje medias para la  $I_{Nav1.5-\beta}$  registrada en células CHO en las que SAP97 era silenciado (siRNA1) o no (*scrambled*) y transfectadas con canales Nav1.5-β o Nav1.5-β + Kir2.1. Cada punto representa la media media  $\pm$  EEM de al menos 12 experimentos/células. Para que se observen con mayor claridad las diferencias entre la densidad de la corriente en los distintos grupos experimentales, los símbolos que indican las diferencias estadísticamente significativas fueron omitidos. (B) Densidad máxima de la  $I_{Nav1.5-\beta}$  registrada en células CHO en las que SAP97 fue silenciado o no (*scrambled*) y transfectadas con los canales Nav1.5-β o Nav1.5-β + Kir2.1. \*  $P < 0.05$  frente a  $I_{Nav1.5-\beta}$  en células transfectadas con un siRNA *scrambled*. #  $P < 0.05$  frente a  $I_{Nav1.5-\beta}$  en células con SAP97 silenciada. Cada barra representa la media  $\pm$  EEM de más de 12 experimentos/células. (ANOVA seguido de un test de Newman-Keuls y un modelo multinivel de efectos mixtos).

3.2.2.2. Efectos del silenciamiento de SAP97 sobre la  $I_{Kir2.1}$  en células CHO

Al igual que sucedía con  $I_{Nav1.5-\beta}$ , la densidad de  $I_{Kir2.1}$  ( $n = 24$ ,  $P < 0.05$ ) estaba significativamente reducida en células en las que SAP97 había sido silenciado respecto a las células transfectadas con el siRNA *scrambled* (Figura V.32). Estos resultados demostrarían que SAP97 juega un papel en la regulación de la expresión de los canales Kir2.1 en la membrana plasmática. Sin embargo, es importante destacar que en células CHO en las que SAP97 había sido silenciado, la cotransfección de canales Nav1.5, aumentaba la  $I_{Kir2.1}$  de igual forma que en células transfectadas con siRNA *scrambled* (Figura V.32A y B).



**Figura V.32. Efectos del silenciamiento de SAP97 sobre la  $I_{Kir2.1}$  en células CHO.** (A) Relaciones densidad de corriente-voltaje medias para la  $I_{Kir2.1}$  registrada en células CHO en las que SAP97 había sido silenciado (siRNA1) o no (*scrambled*) y transfectadas con canales Kir2.1 o Nav1.5-β + Kir2.1. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de al menos 12 experimentos/células. Para que se observen con mayor claridad las diferencias entre la densidad de la corriente en los distintos grupos experimentales, los símbolos que indican las diferencias estadísticamente significativas fueron omitidos. (B) Densidad de la  $I_{Kir2.1}$  a -120 mV registrada en células CHO en las que SAP97 había sido silenciado o no (*scrambled*) y transfectadas con los canales Kir2.1 o Nav1.5-β + Kir2.1. \*  $P < 0.05$  frente a  $I_{Kir2.1}$  en células transfectadas con siRNA *scrambled*. #  $P < 0.05$  frente a  $I_{Kir2.1}$  en células con SAP97 silenciada. Cada barra representa la media  $\pm$  EEM de más de 12 experimentos/células. (ANOVA seguido de un test de Newman-Keuls y un modelo multinivel de efectos mixtos).

Todos estos resultados nos permitieron demostrar que tanto  $\alpha 1$ -sintrofina como SAP97 juegan un importante papel en la regulación de la expresión en membrana de los canales Kir2.1 y Nav1.5. Sin embargo, el hecho de que al silenciar la  $\alpha 1$ -sintrofina, pero no SAP97, se eliminase la

## Resultados

modulación recíproca positiva de los dos canales, demostraba que la  $\alpha 1$ -sintrofina era la verdadera responsable de dicha modulación.

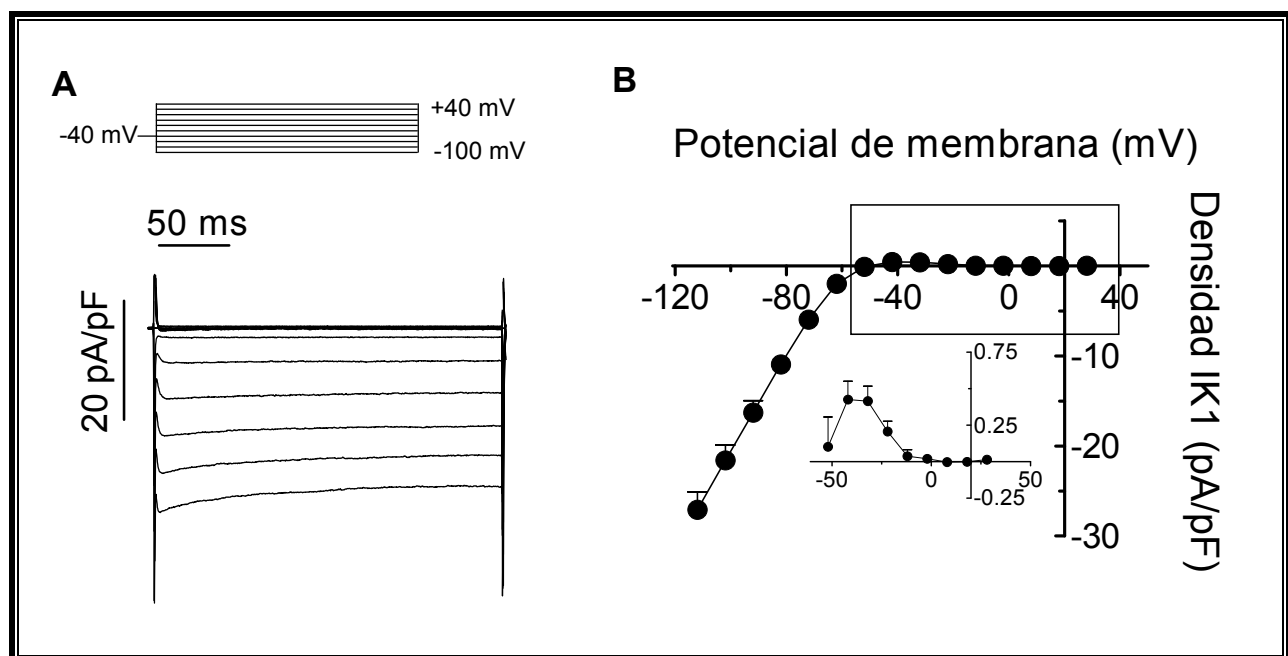
### 3.3. Efectos del silenciamiento de $\alpha 1$ -sintrofina en miocitos ventriculares de rata

Para confirmar el papel de la  $\alpha 1$ -sintrofina en la interacción Kir2.1-Nav1.5 en una célula cardíaca, se registraron la  $I_{K1}$  y la  $I_{Na}$  en miocitos ventriculares de rata disociados enzimáticamente, cultivados e infectados con lentivirus que codificaban para un shRNA específico para silenciar la expresión de la  $\alpha 1$ -sintrofina.

#### 3.3.1. Características electrofisiológicas de la $I_{K1}$ registrada en miocitos ventriculares de rata

En la Figura V.33 se muestran las principales características electrofisiológicas de la  $I_{K1}$  cardíaca registrada en miocitos ventriculares de rata. En el panel A se muestra una familia de trazos de  $I_{K1}$  registrados al aplicar pulsos de 250 ms de duración desde -100 hasta +40 mV en incrementos de 10 mV (potencial de fijación -40 mV).

Tras la aplicación del pulso, la amplitud de la  $I_{K1}$  alcanza un pico máximo de corriente para, a



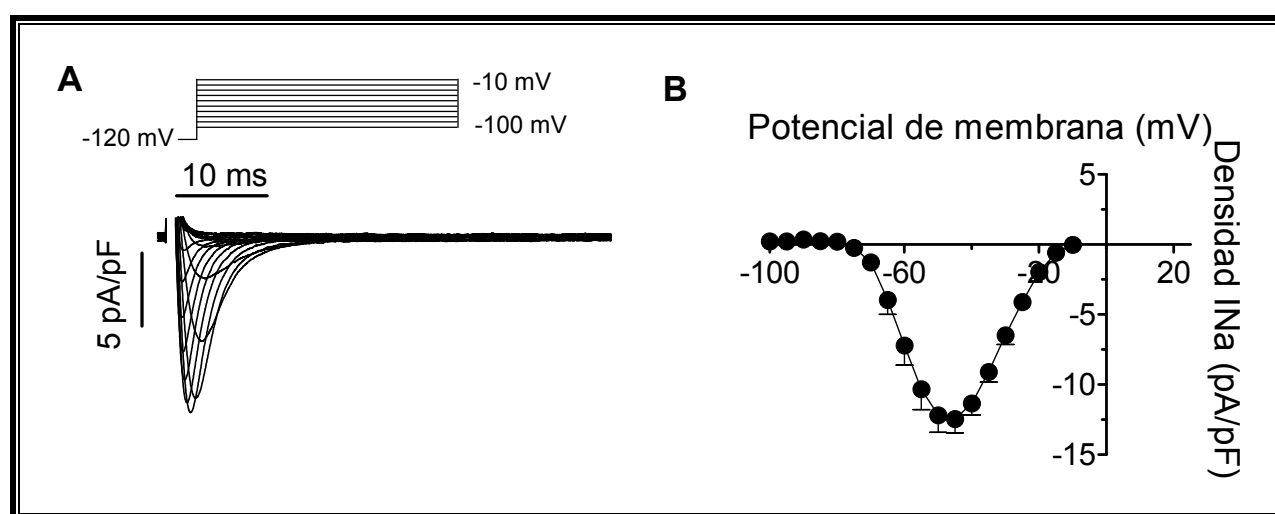
**Figura V.33. Características electrofisiológicas de la  $I_{K1}$  ventricular de rata.** (A) Familia de trazos de la  $I_{K1}$  ventricular de rata registrados tras aplicar el protocolo que se muestra en la parte superior de la figura. (B) Relación densidad de corriente-voltaje para la  $I_{K1}$ . En el recuadro se muestra el rango de potenciales en el que se produce la salida de  $K^+$  y la rectificación en escala expandida. Los potenciales de membrana se han corregido de acuerdo a un LJP de -12 mV. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de 12 miocitos/experimentos.

continuación, disminuir ligeramente a medida que se aplica el pulso hasta alcanzar un nivel estable de corriente. En el panel B se muestra la relación densidad de corriente-voltaje característica de la  $I_{K1}$ , obtenida al representar la densidad de la corriente frente al potencial aplicado. A potenciales más negativos que el  $E_K$ , se registra una corriente de entrada de  $K^+$  de gran amplitud, mientras que a potenciales más positivos que el  $E_K$ , se registra una corriente de  $K^+$  muy pequeña. Además, a medida que el potencial aplicado se va haciendo más positivo, la amplitud de esta corriente de salida disminuye hasta hacerse casi cero debido al fenómeno de rectificación interna.

Todas estas características coinciden con las descritas previamente por otros autores en miocitos ventriculares de rata y de otras especies (Nakamura y cols., 1998; Lopatin y Nichols, 2001; Gómez y cols., 2009; Caballero y cols., 2010a y b; Amorós y cols., 2013; Gómez y cols., 2014) y asimismo, se ha descrito que el canal Kir2.1 es el principal responsable de generar la  $I_{K1}$  en ventrículo de rata (Nakamura y cols., 1998).

### 3.3.2. Características electrofisiológicas de la $I_{Na}$ registrada en miocitos ventriculares de rata

En la Figura V.34 se muestran las principales características electrofisiológicas de la  $I_{Na}$  registrada en miocitos ventriculares de rata. En la Figura V.34A se muestra una familia de trazos de corriente de  $I_{Na}$  que fueron registrados al aplicar pulsos de 50 ms de duración desde -100 mV hasta -10 mV en incrementos de 5 mV (potencial de fijación = -120 mV). Durante la aplicación del pulso despolarizante, la  $I_{Na}$  alcanzaba rápidamente un pico máximo de corriente, y a continuación, la corriente disminuye también de forma muy rápida hasta casi suprimirse por completo, como



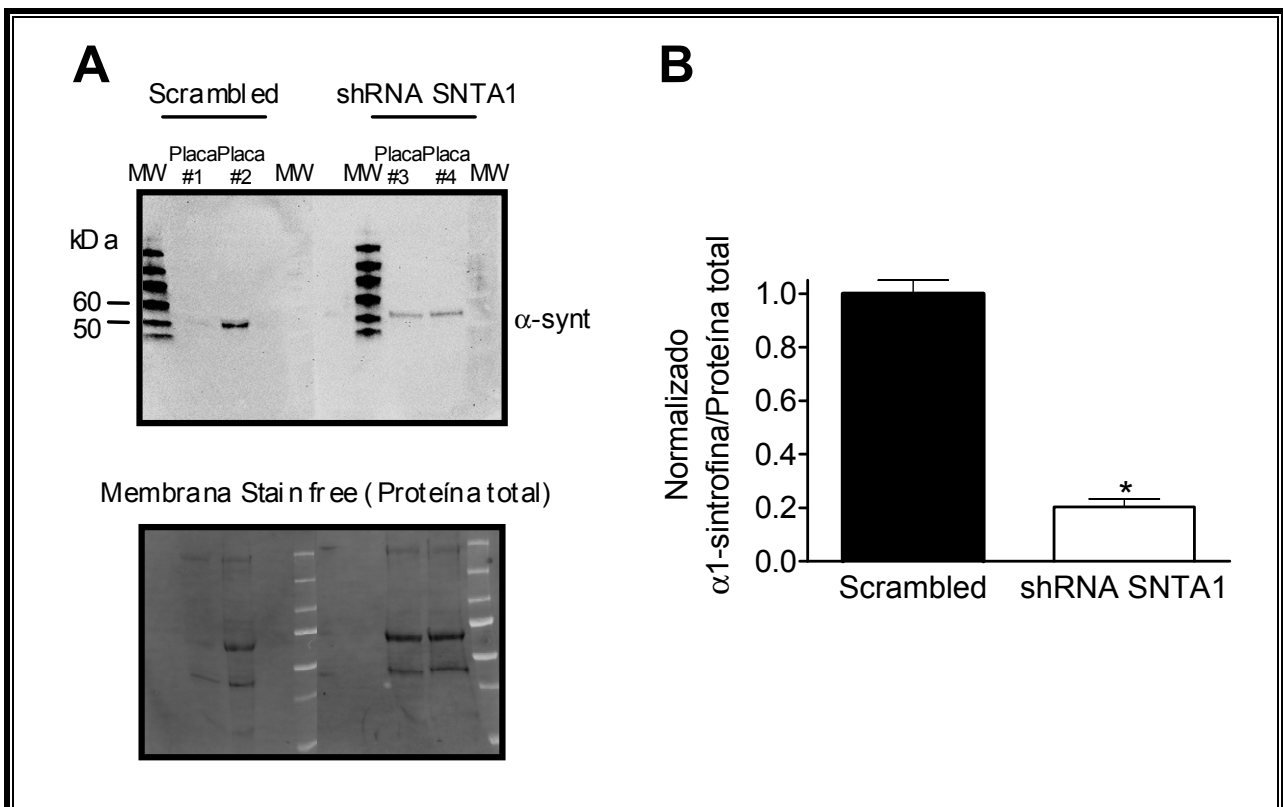
**Figura V.34. Características electrofisiológicas de la  $I_{Na}$  ventricular de rata.** (A) Familia de trazos de la  $I_{Na}$  ventricular de rata registrados tras aplicar el protocolo que se muestra en la parte superior de la figura. (B) Relación densidad de corriente-voltaje para la  $I_{Na}$ . Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de 12 miocitos/experimentos.

## Resultados

consecuencia del paso del canal al estado inactivo (Figura V.34A). En el panel B de la Figura V.34, se muestra la relación densidad de corriente-voltaje con la forma de campana invertida característica de la  $I_{Na}$  obtenida al representar la densidad de la corriente medida como la diferencia entre el pico máximo y el final de cada pulso (50 ms) en función del voltaje aplicado. En nuestras condiciones, el máximo de corriente de entrada se alcanzaba aproximadamente a -50 mV ( $-11 \pm 0.8$  pA/pF) ( $n = 12$ ). Todas estas características coinciden con las descritas previamente por otros autores en miocitos ventriculares de rata (Qu y cols., 1994; Milstein y cols., 2012)

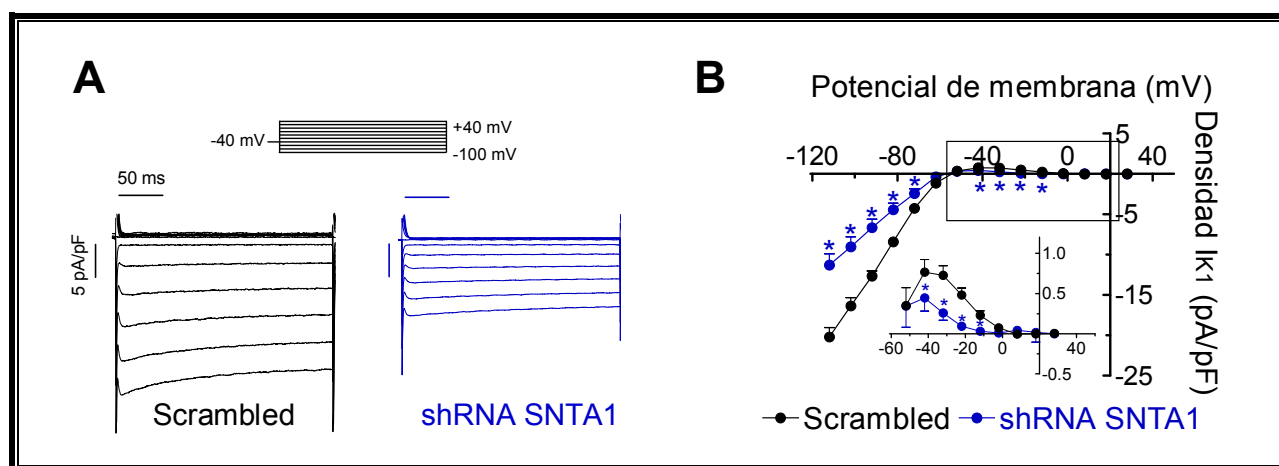
### 3.3.3. Efectos del silenciamiento de la $\alpha$ 1-sintrofina sobre la modulación de $I_{K1}$ e $I_{Na}$

La  $I_{Na}$  y la  $I_{K1}$  fueron registradas en miocitos de rata adulta cultivados en los que la  $\alpha$ 1-sintrofina fue silenciada con construcciones lentivirales que contenían un shRNA para silenciar la expresión  $\alpha$ 1-sintrofina y GFP como marcador. En la Figura V.35A (parte superior) se puede apreciar que la expresión de la  $\alpha$ 1-sintrofina, que aparece entre 50 y 60 KDa, es menor (79.6%) en los miocitos infectados con el lentivirus que codificaba para el shRNA de  $\alpha$ 1-sintrofina que en las células infectadas con el lentivirus *scrambled* (Figura V.35B). Para normalizar la cantidad de proteína en este caso se utilizó la cantidad de proteína total como control de carga (Figura V.35A, parte inferior).



**Figura V.35. (Página anterior) Silenciamiento de  $\alpha 1$ -sintrofina utilizando shRNAs en miocitos ventriculares de rata. (A)** *Immunoblots* representativos después de la detección de  $\alpha 1$ -sintrofina por quimioluminiscencia (Arriba) en miocitos ventriculares de rata cultivados durante 48 h con un lentivirus que codificaba para un shRNA SNTA1 o para un shRNA *scrambled* (control). La correspondiente membrana *Stain free* (proteína total) se muestra en la parte inferior de la figura. Cada carril corresponde a una placa de células infectadas con lentivirus. **(B)** Media del análisis densitométrico de los niveles de  $\alpha 1$ -sintrofina normalizados a proteína total en células infectadas con lentivirus que codificaba para el shRNA SNTA1 o para el shRNA *scrambled*. Los resultados están expresados como intensidad media, y representan los datos de tres ratas y 12 placas. En B, \*  $P < 0.05$  frente a scrambled (Se realizó ANOVA seguido de un test de Newman-Keuls y un modelo multinivel de efectos mixtos).

Como se puede observar en la Figura V.36, es importante destacar que el silenciamiento de  $\alpha 1$ -sintrofina en miocitos ventriculares de rata reducía significativamente la densidad de la corriente generada por los canales Kir2.x. Asimismo, el silenciamiento de esta proteína no causó ninguna alteración en las propiedades electrofisiológicas de la  $I_{K1}$  de tal forma que la corriente generada por los canales Kir2.x en miocitos con la  $\alpha 1$ -sintrofina silenciada era idéntica a la generada por los canales Kir2.x en miocitos control (Figura V.36A). Por lo tanto, la disminución significativa de la densidad de corriente que se observa en la Figura 36 era debida únicamente a que el silenciamiento de  $\alpha 1$ -sintrofina disminuía la expresión en membrana de los canales Kir2.x.

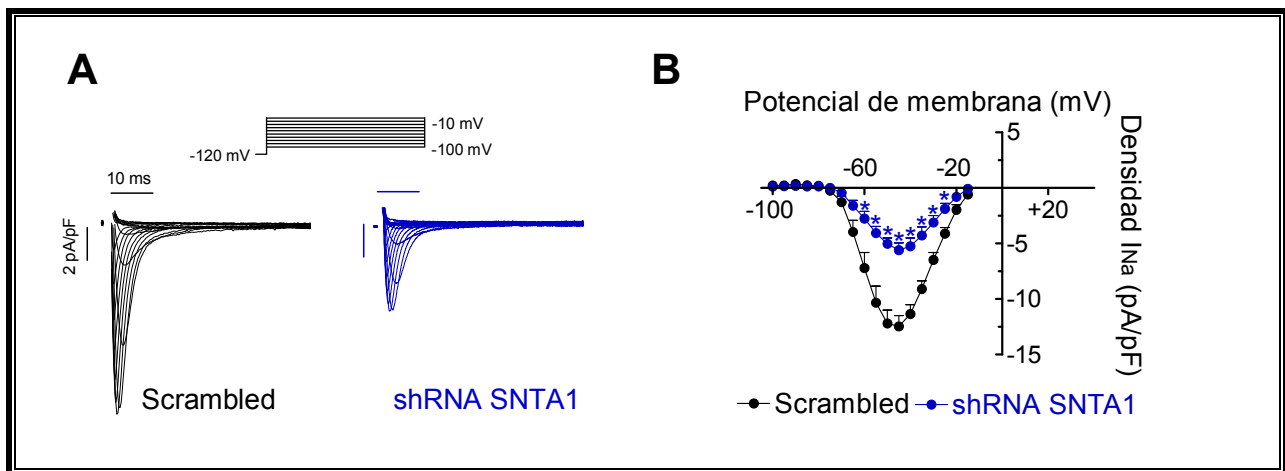


**Figura V.36. Efectos del silenciamiento de  $\alpha 1$ -sintrofina utilizando shRNAs sobre la  $I_{K1}$  registrada en miocitos ventriculares de rata . (A)** Familias de trazos de  $I_{K1}$  registrados en miocitos ventriculares disociados enzimáticamente y cultivados durante 48h con lentivirus que codificaban para un shRNA scrambled (derecha) o un shRNA de  $\alpha 1$ -sintrofina. **(B)** Media de las relaciones densidad de corriente-voltaje construidas para  $I_{K1}$  registradas en miocitos ventriculares de rata adulta infectados durante 48 horas con una construcción lentiviral que codificaba o bien para un shRNA *scrambled* + GFP (scrambled) o para shRNA de  $\alpha 1$ -sintrofina + GFP (shRNA-SNTA1). Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de 13 experimentos/miocitos de tres ratas distintas. En B, \*  $P < 0.05$  frente a scrambled (ANOVA seguido de un test de Newman-Keuls y un modelo multinivel de efectos mixtos).

Asimismo, como se puede observar en la Figura V.37, el silenciamiento de  $\alpha 1$ -sintrofina en miocitos ventriculares de rata reducía significativamente la densidad de la  $I_{Na}$ , tal y como sucedía con la  $I_{K1}$ . El silenciamiento de la  $\alpha 1$ -sintrofina no causó ninguna alteración en las propiedades electrofisiológicas de la  $I_{Na}$  de tal forma que las propiedades de la corriente generada por los canales

## Resultados

Nav1.5 en miocitos con la  $\alpha$ 1-sintrofina silenciada eran idénticas a la generada por los canales Nav1.5 en miocitos control (Figura V.37A). Por lo tanto, la disminución significativa de la densidad de corriente que se observa en la Figura 37 era debida únicamente a que el silenciamiento de  $\alpha$ 1-sintrofina disminuía la expresión en membrana de los canales Nav1.5 al igual que sucedía con los canales Kir2.x.



**Figura V.37. Efectos del silenciamiento de  $\alpha$ 1-sintrofina utilizando shRNAs sobre la  $I_{Na}$  registrada en miocitos ventriculares de rata . (A)** Familias de trazos de  $I_{Na}$  registrados en miocitos ventriculares disociados enzimáticamente y cultivados durante 48h con lentivirus que codificaban para un shRNA scrambled (derecha) o un shRNA de  $\alpha$ 1-sintrofina. **(B)** Media de las relaciones densidad de corriente-voltaje construidas para  $I_{Na}$  registradas en miocitos ventriculares de rata adulta infectados durante 48 horas con una construcción lentiviral que codificaba o bien para un shRNA *scrambled* + GFP (*scrambled*) o para shRNA de  $\alpha$ -1-sintrofina + GFP (shRNA-SNTA1). Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de 13 experimentos/miocitos de tres ratas distintas. En B, \*  $P < 0.05$  frente a scrambled (ANOVA seguido de un test de Newman-Keuls y un modelo multinivel de efectos mixtos).

Los resultados demostraron que las densidades de  $I_{Na}$  e  $I_{K1}$  disminuían significativamente en los miocitos ventriculares de rata en los que se había silenciado la  $\alpha$ 1-sintrofina, confirmando que esta proteína PDZ es la responsable de la modulación recíproca positiva entre los canales Kir2.1-2.2 y Nav1.5 en el miocardio.

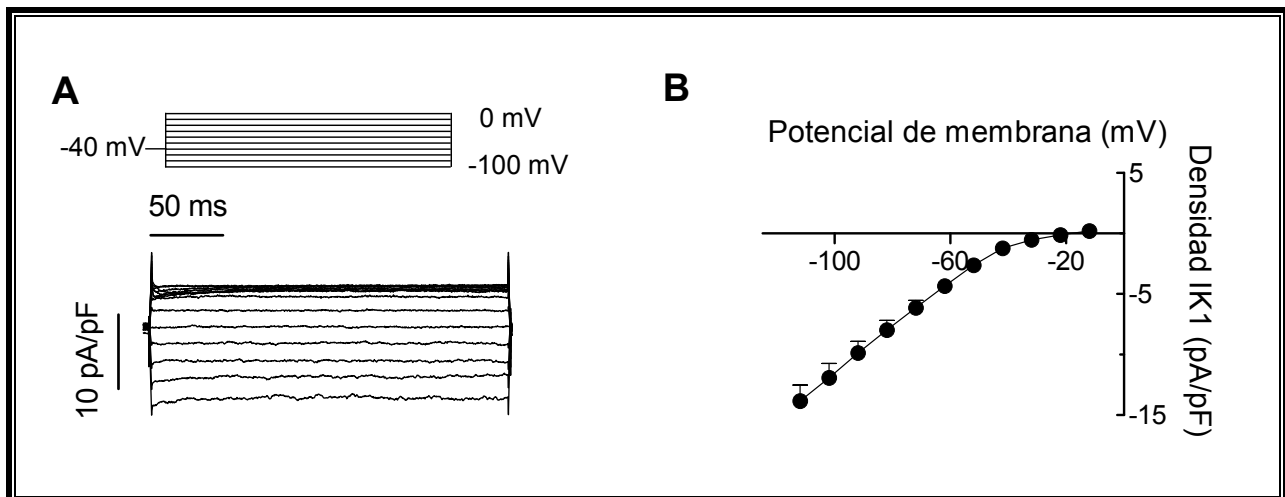
## 4. MODULACIÓN RECÍPROCA POSITIVA DE Kir2.x Y Nav1.5 EN AURÍCULA HUMANA

En el siguiente grupo de experimentos, quisimos determinar la relevancia fisiopatológica de la modulación Kir2.x-Nav1.5 en el miocardio humano. Diversos grupos de investigación han descrito de forma consistente que la densidad de la  $I_{K1}$  aumenta marcadamente en miocitos auriculares obtenidos de pacientes con FAC con respecto a la registrada en miocitos de pacientes en RS (Dobrev y cols., 2001; Voigt y cols., 2010; González de la Fuente y cols., 2013). Este aumento se

asocia a un incremento de la expresión de los canales Kir2.1 (Dobrev y cols., 2001) y es uno de los eventos críticos del proceso de remodelado eléctrico. De hecho, se ha propuesto que el aumento de la  $I_{K1}$  es una de las causas del mantenimiento de los circuitos de reentrada espirales característicos de las arritmias fibrilatorias como la FA. Para identificar si este aumento de la  $I_{K1}$  conducía al incremento de la  $I_{Na}$ , registramos ambas corrientes en miocitos auriculares disociados enzimáticamente a partir de orejuelas obtenidas de pacientes con FAC o en RS sometidos a cirugía cardíaca en el Hospital Universitario Gregorio Marañón (Gómez y cols., 2009; Caballero y cols., 2010a y b; Amorós y cols., 2013; Barana y cols., 2014; Pérez-Hernández y cols., 2016). Las características clínicas de los pacientes se describen en la Tabla IV.3. Es importante destacar que en el grupo de FAC, únicamente se incluyeron pacientes con más de 6 meses de evolución. Como se puede observar el diámetro de la aurícula izquierda era mayor en los pacientes con FAC ( $P < 0.05$ ), resultado que concuerda con lo descrito en otros estudios (Karen y cols., 1987; Andersen y cols., 1991; Dittrich y cols., 1999). A nivel celular observamos que la capacitancia, que es un índice del tamaño de la célula, de los miocitos procedentes de pacientes con FAC fue significativamente mayor ( $100.3 \pm 5.6$  pF;  $n=51$ ) que la de los procedentes de pacientes en RS ( $76.8 \pm 5.6$  pF,  $n=70$ ;  $P < 0.05$ ). Sin embargo, no existían diferencias significativas en el resto de características, como la cardiopatía del paciente, la edad, el sexo o el tratamiento farmacológico.

#### 4.1. Características electrofisiológicas de la $I_{K1}$ registrada en miocitos auriculares humanos

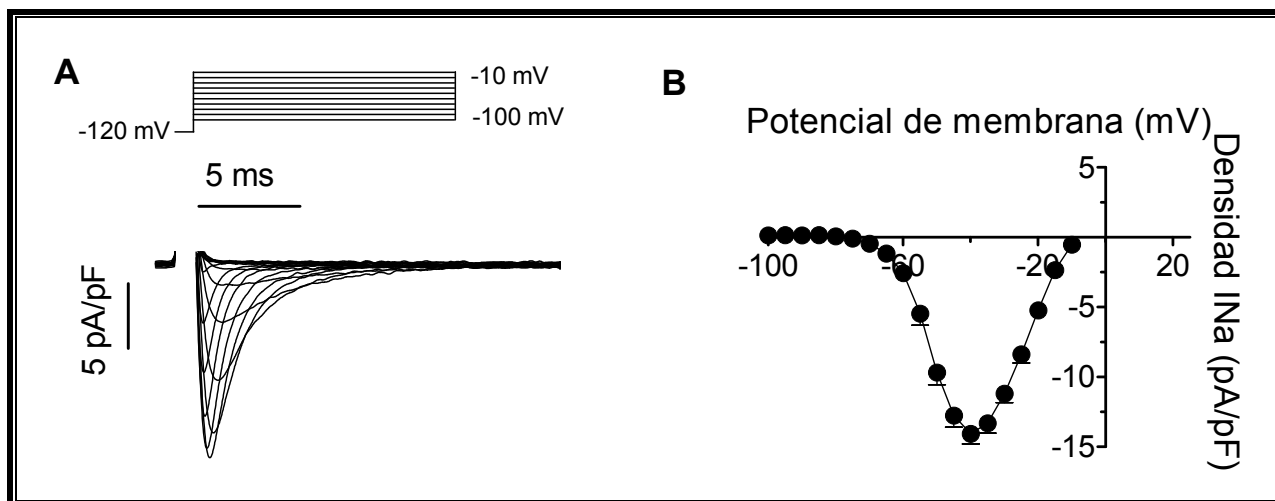
En la Figura V.38 se muestran las principales características electrofisiológicas de la  $I_{K1}$  cardíaca registrada en miocitos auriculares humanos. En el panel A se muestra una familia de trazos de  $I_{K1}$  registrados al aplicar pulsos de 250 ms de duración desde -100 hasta 0 mV en incrementos de 10 mV (potencial de fijación -40 mV). Tras la aplicación del pulso, la amplitud de la  $I_{K1}$  alcanza un pico máximo de corriente para, a continuación, disminuir ligeramente a medida que se aplica el pulso hasta alcanzar un nivel estable de corriente. En el panel B se muestra la relación densidad de corriente-voltaje característica de la  $I_{K1}$ , obtenida al representar la densidad de la corriente frente al potencial aplicado. A potenciales más negativos que el  $E_K$ , se registra una corriente de entrada de  $K^+$  cuya amplitud va disminuyendo de forma gradual a medida que el potencial del pulso es más positivo. A potenciales más positivos que el  $E_K$ , se registra una corriente de  $K^+$  de pequeña amplitud como consecuencia del fenómeno de rectificación interna comentado con anterioridad (Figura V.38B). Todas estas características coinciden con las descritas previamente por otros autores en miocitos auriculares humanos (Koumi y cols., 1995a; Wang y cols., 1998, Caballero y cols., 2010a, Amorós y cols., 2013; Gómez y cols., 2014),



**Figura V.38. Características electrofisiológicas de la  $I_{K1}$  auricular humana.** (A) Familia de trazos de la  $I_{K1}$  auricular humana registrados tras aplicar el protocolo que se muestra en la parte superior de la figura. (B) Relación densidad de corriente-voltaje para la  $I_{K1}$ . Los potenciales de membrana se han corregido de acuerdo a un LJP de  $-11.3$  mV. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de 20 miocitos/experimentos.

#### 4.2. Características electrofisiológicas de la $I_{Na}$ registrada en miocitos auriculares humanos

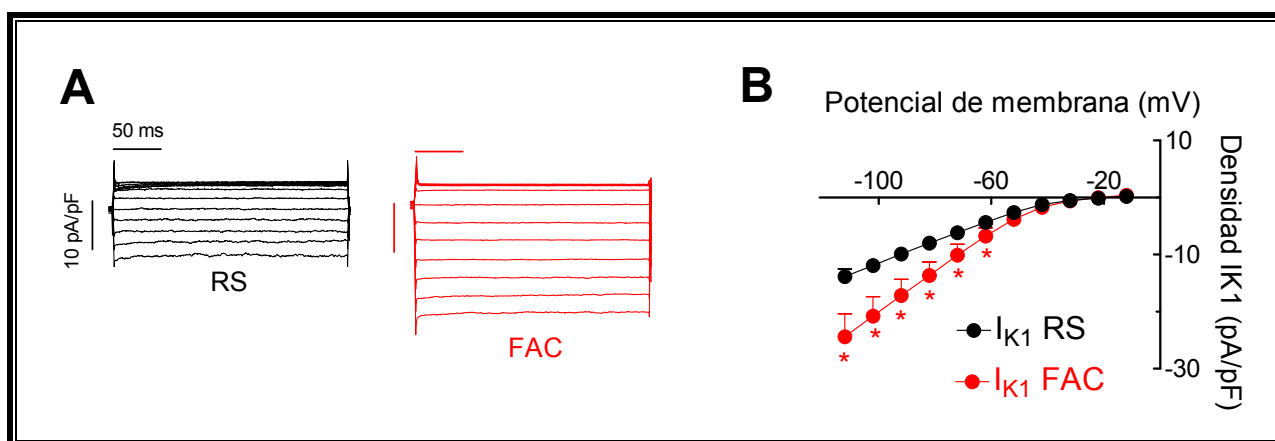
En la Figura V.39 se muestran las principales características electrofisiológicas de la  $I_{Na}$  registrada en miocitos auriculares humanos. En el panel A se muestra una familia de trazos de corriente  $I_{Na}$  que fueron registrados al aplicar pulsos de 50 ms de duración desde  $-100$  mV hasta  $-10$  mV en incrementos de 5 mV (potencial de fijación =  $-120$  mV). Tras la aplicación del pulso despolarizante, la  $I_{Na}$  alcanzaba rápidamente un pico máximo de corriente ( $\tau_{act} = 0.3 \pm 0.02$  ms), disminuyendo también de forma rápida hasta suprimirse casi completamente como consecuencia del paso del canal a su estado inactivo ( $\tau_{inact\ rápida} = 1.4 \pm 0.04$  ms;  $\tau_{inact\ lenta} = 13.5 \pm 1.1$  ms). (Figura V.39A). En el panel B de la Figura V.39, se muestra la relación densidad de corriente-voltaje con forma de campana invertida característica de la  $I_{Na}$  obtenida al representar la densidad de la corriente medida como la diferencia entre el pico máximo y el final de cada pulso (50 ms) en función del voltaje aplicado. A potenciales entre  $-100$  y  $-70$  mV, no se registraban corrientes de  $Na^+$  voltaje-dependientes. A potenciales más positivos de  $-60$  mV, la corriente aumentaba hasta alcanzar el máximo aproximadamente a  $-40$  mV ( $-14.1 \pm 0.7$  pA/pF) ( $n > 20$ ). A potenciales más positivos, la amplitud de la corriente disminuía progresivamente como consecuencia de la inactivación voltaje-dependiente del canal. Todas estas características coinciden con las descritas previamente por otros autores en miocitos auriculares humanos (Sakakibara y cols., 1992 y 1993).



**Figura V.39. Características electrofisiológicas de la  $I_{Na}$  auricular humana.** (A) Familia de trazos de la  $I_{Na}$  auricular humana registrados tras aplicar el protocolo que se muestra en la parte superior de la figura. (B) Relación densidad de corriente-voltaje para la  $I_{Na}$ . Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de 20 miocitos/experimentos.

#### 4.3. Efectos del aumento de la $I_{K1}$ sobre la $I_{Na}$ en aurícula humana

En los siguientes grupos de experimentos, quisimos comparar la  $I_{K1}$  y la  $I_{Na}$  registradas en miocitos procedentes de pacientes en RS con las registradas en miocitos procedentes de pacientes con FAC. En la Figura V.40, se muestran trazos de  $I_{K1}$  (Panel A) registrados en ambos grupos de miocitos tras aplicar pulsos de 250 ms desde -40 mV hasta potenciales entre -100 y 0 mV, así como las correspondientes relaciones densidad de corriente-voltaje (Panel B). Como se puede observar, la

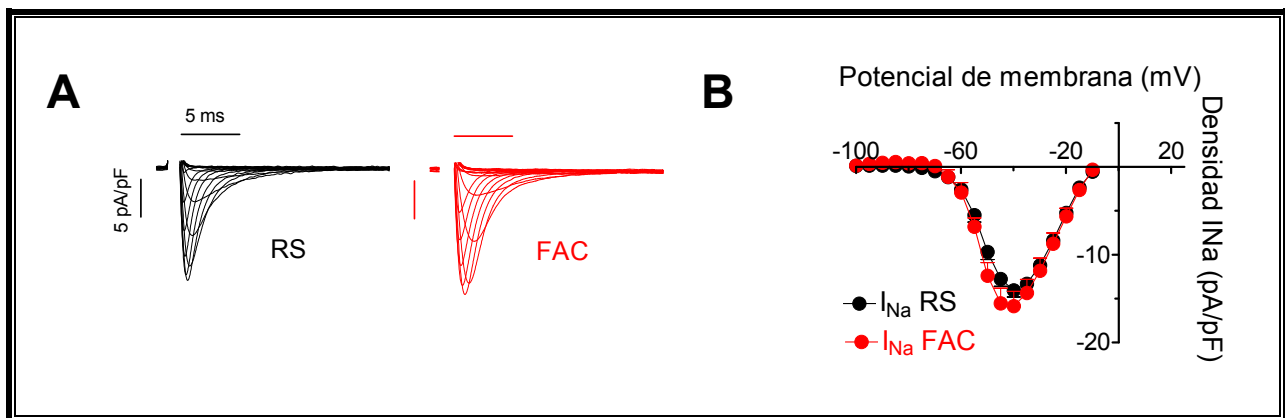


**Figura V.40. La densidad de la  $I_{K1}$  auricular está incrementada significativamente en pacientes con FAC.** (A). Familias de trazos de  $I_{K1}$  registrados en miocitos auriculares disociados enzimáticamente a partir de la orejuela auricular derecha extraída de pacientes en ritmo sinusal (RS,  $N = 6$ ) o con fibrilación auricular crónica (FAC,  $N = 6$ ). (B). Relaciones densidad de corriente-voltaje medias para la  $I_{K1}$  registrada en ambos grupos de miocitos. En (B),  $* P < 0.05$  frente a RS. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de al menos 20 experimentos/miocitos. En (B), se realizó un ANOVA seguido del test de Newman-Keuls y un modelo multinivel de efectos mixtos.

## Resultados

densidad de la  $I_{K1}$  registrada en miocitos de pacientes con FAC era significativamente mayor que la registrada en pacientes en RS a potenciales entre -100 y -50 mV ( $P < 0.05$ ), sin producir cambios significativos en la cinética de activación o caída de la corriente o en el potencial de inversión ( $P > 0.05$ ).

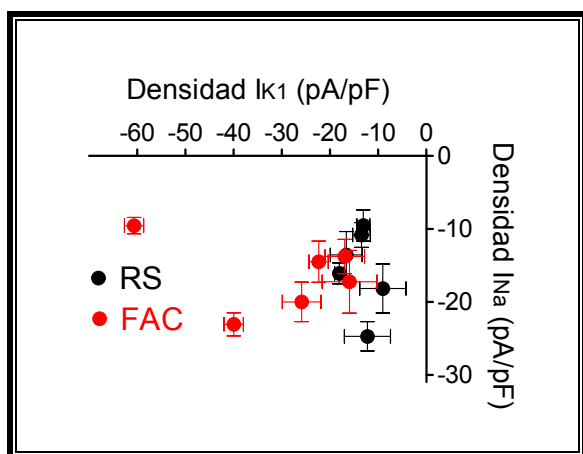
En cambio, la densidad media de  $I_{Na}$  fue similar en los dos grupos de miocitos (Figura V.41). Tampoco se observaron diferencias en la cinética de activación, inactivación o en la dependencia de voltaje de la activación o la inactivación. Para hacer un estudio más detallado, representamos la densidad media de la  $I_{K1}$  (eje de abscisas) en función de la densidad media de la  $I_{Na}$  (eje de ordenadas) calculadas para cada paciente en RS y con FAC (Figura V.42). En caso de que hubiese



**Figura V.41. La densidad de la  $I_{Na}$  auricular no está incrementada significativamente en pacientes con FAC. (A).** Familias de trazos de  $I_{Na}$  registrada en miocitos auriculares disociados enzimáticamente a partir de la orejuela auricular derecha extraída de pacientes en ritmo sinusal (RS,  $N = 6$ ) o fibrilación auricular crónica (FAC,  $N = 6$ ). **(B).** Relaciones densidad de corriente-voltaje medias para la  $I_{Na}$  registrada en ambos grupos de miocitos. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de al menos 20 experimentos/miocitos. En (B), se realizó un ANOVA seguido del test de Newman-Keuls y un modelo multinivel de efectos mixtos.

modulación recíproca positiva, existiría una correlación positiva entre ambas densidades, de tal forma que a mayor densidad de la  $I_{K1}$  mayor densidad de la  $I_{Na}$ . Sin embargo, tal y como puede observarse, no existe una correlación entre los valores de densidad de  $I_{K1}$  y de  $I_{Na}$ , lo que demuestra que en miocitos auriculares humanos, el aumento de la  $I_{K1}$  producido por la FAC no se acompaña de un aumento en la  $I_{Na}$ . Como se ha mencionado con anterioridad, diversos datos electrofisiológicos y de biología molecular (Gaborit y cols., 2007, Caballero y cols., 2010a) demostraban que los canales Kir2.3 jugaban un papel crítico en la formación de los canales que generan la  $I_{K1}$  en la aurícula humana. Los resultados obtenidos en sistemas de expresión heterólogos (Apartados 1.1 y 1.4) indicaban que la presencia de Kir2.3 en los canales homo- o heterotetraméricos suprimía la modulación positiva entre canales Kir2.x y Nav1.5. Por tanto, nuestros

resultados confirmarían el importante papel de Kir2.3 en la  $I_{K1}$  auricular humana y permitirían explicar la ausencia de la modulación positiva  $I_{K1}$ - $I_{Na}$  en los miocitos auriculares humanos.



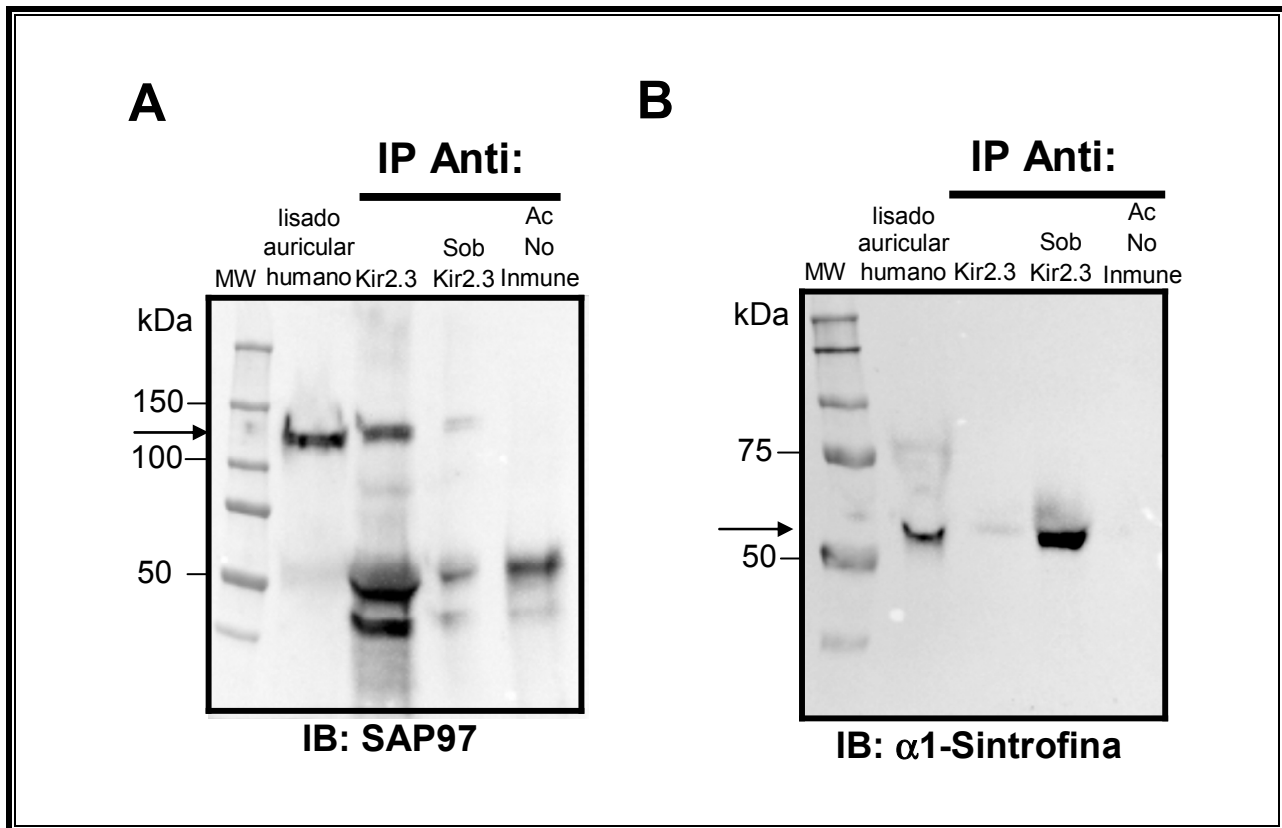
**Figura IV.42.** El incremento de densidad de la  $I_{K1}$  registrada en miocitos auriculares de pacientes con FAC no se acompaña de un incremento en la densidad de la  $I_{Na}$ . Valores medios calculados para cada paciente de las densidades de  $I_{K1}$  e  $I_{Na}$ . Los datos incluyen al menos 8 miocitos en cada paciente.  $N = 6$  pacientes en cada grupo.

#### 4.4. Estudio de interacción entre Kir2.3, SAP97 y $\alpha$ 1-sintrofina en aurícula humana

En el siguiente grupo de experimentos, quisimos determinar si la ausencia de la modulación positiva  $I_{K1}$ - $I_{Na}$  *in vivo* en la aurícula humana, era debida a la imposibilidad de los canales Kir2.3 de unirse a las proteínas con dominios PDZ SAP97 o  $\alpha$ 1-sintrofina. Para ello realizamos ensayos de co-inmunoprecipitación en muestras de orejuela auricular izquierda proveniente de pacientes en RS ( $N = 3$ ), utilizando los procedimientos detallados en apartados anteriores.

Como puede observarse en la Figura V.43A, en la aurícula humana la proteína de anclaje SAP97, cuya banda aparece a un peso molecular de entre 100 y 150 KDa, co-inmunoprecipitaba con los canales Kir2.3. Sin embargo, la  $\alpha$ 1-sintrofina, cuya banda aparecía entre 50 y 75 KDa, no co-inmunoprecipitaba con dichos canales.

Todos los resultados obtenidos en aurícula humana demostraban que, *in vivo*, la presencia de los canales Kir2.3 evitaba la modulación recíproca positiva Nav1.5-Kir2.1/2.2 impidiendo la interacción de los canales Kir2.x con la  $\alpha$ 1-sintrofina, lo que confirmaba que la proteína de anclaje involucrada en la modulación recíproca era la  $\alpha$ 1-sintrofina y no SAP97.



**Figura V.43. SAP97, pero no  $\alpha$ 1-sintrofina, co-inmunoprecipita con los canales Kir2.3 en la aurícula humana.** SAP97 (A) pero no la  $\alpha$ 1-sintrofina (B) co-inmunoprecipita con Kir2.3 incluso en lisados de muestras de orejuela auricular derecha humana ( $N = 3$ ). También se muestra el sobrenadante (Sob) recuperado después de la centrifugación del inmunoprecipitado de Kir2.3. En (A) y (B) para las reacciones de inmunoprecipitación se utilizaron preparaciones enriquecidas de membrana. Como control negativo, el lisado fue tratado con una IgG no específica (y proteína A/G) (carril con “Ac. No Inmune”). Las flechas indican la altura de las bandas correspondientes a SAP97 (A) y  $\alpha$ 1-sintrofina. IB, anticuerpo utilizado para *immunoblotting*; IP, anticuerpo utilizado para la inmunoprecipitación

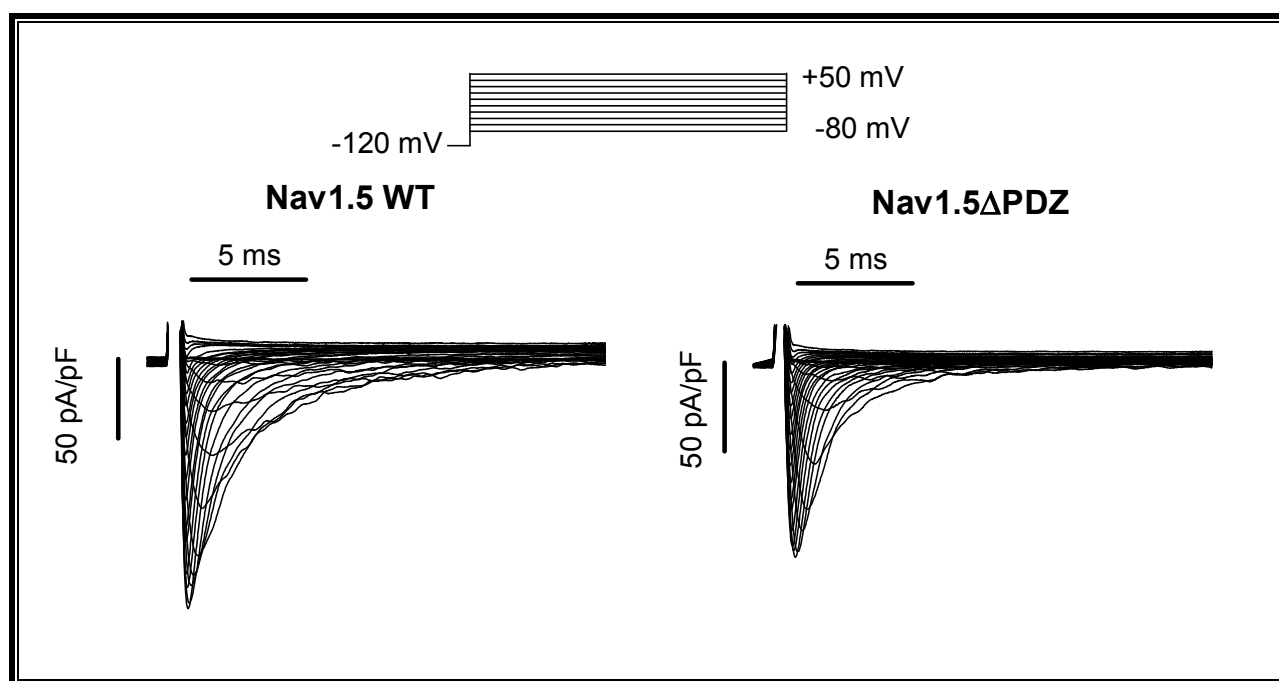
## 5. PAPEL DE LOS EXTREMOS N- Y C-TERMINALES DE LOS CANALES Nav1.5 EN LA MODULACIÓN RECÍPROCA POSITIVA

### 5.1. Papel de la secuencia de unión a dominios PDZ situada en el extremo C-terminal

Ha sido ampliamente demostrado que el canal Nav1.5 interacciona con la  $\alpha$ 1-sintrofina mediante una secuencia de unión a dominios PDZ situada en el extremo C-terminal del canal (Ser, Ala y Val; SIV) (Gee y cols., 1998; Gavillet y cols., 2006; Eichel y cols., 2016). De hecho, datos recientes habían demostrado que la eliminación de esta secuencia en ratones daba lugar a una reducción significativa de la densidad de la  $I_{Na}$  en la membrana lateral de los miocitos ventriculares, pero no en los discos intercalares (Shy y cols., 2014). Los autores proponían que dicha secuencia era crucial para la interacción de los canales Nav1.5 con la  $\alpha$ 1-sintrofina y, en consecuencia, para la

expresión de los mismos en la membrana lateral (Shy y cols., 2014). En base a estos resultados, quisimos determinar el papel de esta secuencia en la modulación recíproca positiva Nav1.5-Kir2.1. Para ello, realizamos experimentos de mutagénesis dirigida que nos permitieron construir un canal Nav1.5 en el que se había suprimido la secuencia SIV (Nav1.5 $\Delta$ PDZ), mediante la introducción de un codón de terminación en la región correspondiente.

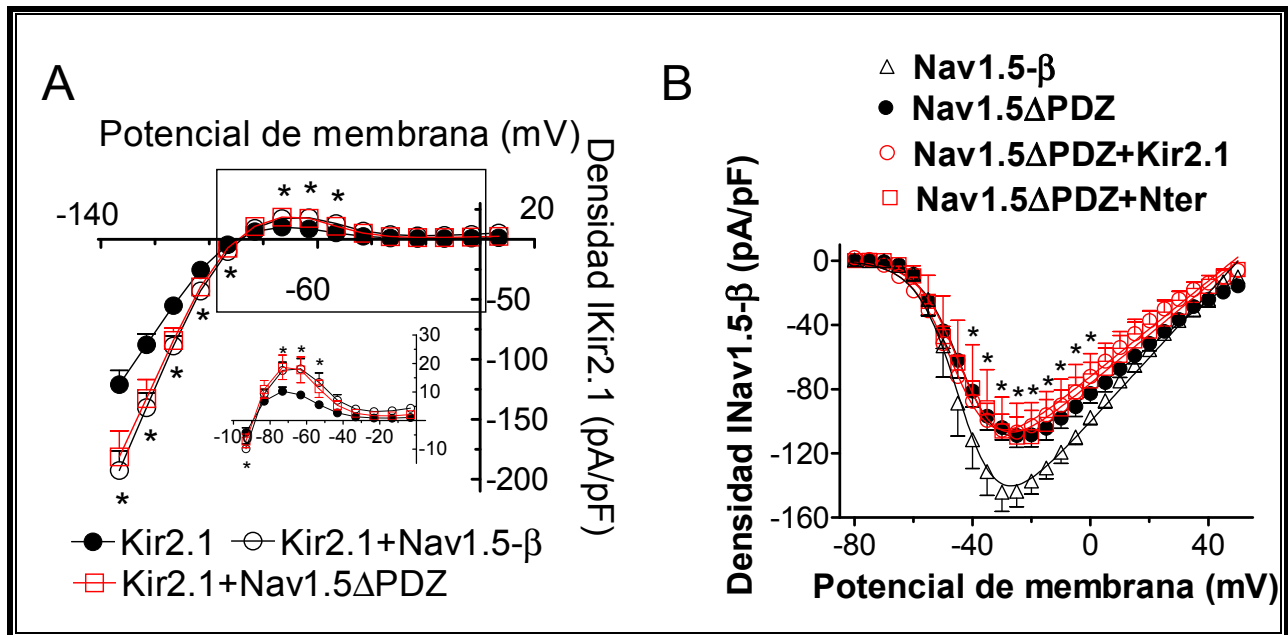
Como puede observarse en la Figura V.44, y en concordancia con lo descrito con anterioridad (Gavillet y cols., 2006; Shy y cols., 2014), la densidad de la  $I_{Nav1.5}$  registrada en células CHO transfectadas de forma transitoria con el ADNc que codificaba la expresión de Nav1.5 $\Delta$ PDZ era significativamente menor a la generada por los canales Nav1.5 WT. Sin embargo, la supresión de la secuencia SIV no produjo ningún cambio en las propiedades tiempo- o voltaje-dependientes de la corriente (Figura V.44).



**Figura V.44.** La supresión de los tres últimos aminoácidos de Nav1.5 (Nav1.5 $\Delta$ PDZ) únicamente produce una disminución en la expresión del canal en membrana. Familias de trazos de  $I_{Nav1.5}$  e  $I_{Nav1.5\Delta PDZ}$  registrados en células CHO tras aplicar un protocolo de pulsos que se muestra en la parte superior de la figura.

La Figura V.45A muestra las relaciones densidad de corriente-voltaje generadas por los canales Kir2.1 cuando se transfectaron solos o conjuntamente con canales Nav1.5- $\beta$  o Nav1.5 $\Delta$ PDZ. Sorprendentemente, la densidad de la  $I_{Kir2.1}$  registrada en células cotransfectadas con canales Kir2.1 y Nav1.5 $\Delta$ PDZ era muy similar a la registrada en células cotransfectadas con los canales Nav1.5- $\beta$

(Figura V.45A). Por el contrario, es importante destacar que la cotransfección de canales Kir2.1 no aumentaba la densidad de la corriente generada por los canales Nav1.5ΔPDZ (Figura V.45B).



**Figura V.45. La expresión de los canales Nav1.5ΔPDZ aumentan la densidad de la  $I_{Kir2.1}$ , pero la de los canales Kir2.1 no modifica la densidad de la  $I_{Nav1.5ΔPDZ}$ .** (A) Relaciones densidad de corriente-voltaje medias de  $I_{Kir2.1}$  registradas en células CHO que expresaban canales Kir2.1 solos, Kir2.1 + Nav1.5-β, o Kir2.1 + Nav1.5ΔPDZ. (B) Relaciones densidad de corriente-voltaje medias de  $I_{Nav1.5}$  e  $I_{Nav1.5ΔPDZ}$  registradas en células CHO que expresaban canales Nav1.5-β solos, Nav1.5ΔPDZ solos, Kir2.1 + Nav1.5ΔPDZ, o cuando se cotransfectaban el extremo N-terminal de Nav1.5 (Nter, 132 aa) y los canales Nav1.5ΔPDZ. En (A), \*  $P < 0.05$  frente a Kir2.1 o Kir2.2 solo. En (B) \*  $P < 0.05$  frente a Nav1.5-β solo (ANOVA seguido del test de Newman-Keuls y un modelo multinivel de efectos mixtos). Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de  $> 25$  experimentos/células.

A partir de estos resultados, podemos concluir que los canales Nav1.5ΔPDZ modulaban positivamente la expresión de los canales Kir2.1, mientras que la expresión de los canales Nav1.5ΔPDZ no podía ser modulada positivamente por los canales Kir2.1. Por tanto, proponemos que para que la expresión de los canales Nav1.5 sea modulada positivamente por la coexpresión de los canales Kir2.1, es necesario que ambos tipos de canales puedan unirse a la  $\alpha 1$ -sintrofina a través de sus extremos C-terminales y por tanto, es indispensable que el canal Nav1.5 mantenga íntegra su secuencia de unión a dominios PDZ SIV.

Por el contrario, para que la expresión de los canales Kir2.1 sea modulada positivamente por la coexpresión de los canales Nav1.5, no es indispensable que el canal Nav1.5 se una a  $\alpha 1$ -sintrofina a través de su extremo C-terminal, lo que podría sugerir que este canal es capaz de unirse a esta proteína de anclaje a través de alguna otra secuencia localizada en una región del canal distinta a la SIV.

## 5.2. Papel del dominio N-terminal de Nav1.5

Tal y como se ha mencionado en la Introducción, hasta fechas recientes el papel del dominio N-terminal en el control de la expresión en la membrana del canal Nav1.5 era totalmente desconocido e insospechado. En este contexto, Clatot y colaboradores habían demostrado que la cotransfección de los canales Nav1.5 con un plásmido que codifica la expresión del dominio N-terminal de Nav1.5 (Nter, péptido de 132 aminoácidos) aumentaba marcadamente la densidad de la  $I_{Nav1.5}$  registrada en células HEK293 (Clatot y cols., 2012). Sorprendentemente, en este trabajo los autores no profundizaron más y no identificaron ni el posible mecanismo ni los determinantes moleculares de este efecto. De hecho, se limitaban a proponer que el Nter podría actuar a modo de "señuelo" permitiendo que un mayor número de canales Nav1.5 superase los sistemas de control de calidad celular, y llegase a la membrana de la célula (Clatot y cols., 2012). Con el objetivo de determinar el papel que jugaría el dominio N-terminal del canal Nav1.5 en la modulación recíproca positiva Kir2.x-Nav1.5, analizamos los efectos de la cotransfección del fragmento Nter sobre la  $I_{Kir2.x}$  y la  $I_{Nav1.5}$  en células CHO y en miocitos ventriculares de rata.

### 5.2.1. Efectos del fragmento Nter sobre la $I_{Kir2.x}$ y la $I_{Nav1.5}$ registradas en células CHO

En las Figuras V.46A y 46B, se muestran las relaciones densidad de corriente–voltaje para  $I_{Kir2.1}$  e  $I_{Kir2.3}$  registradas en células CHO que habían sido transfectadas con cada uno de los canales (1.6  $\mu$ g) conjuntamente o no con el fragmento Nter (1.6  $\mu$ g). Como se puede observar, la cotransfección de Nter aumentaba significativamente la densidad de la  $I_{Kir2.1}$  a potenciales negativos y positivos al  $E_K$ . De hecho, el aumento producido por el Nter, resultó prácticamente idéntico al producido por el canal Nav1.5 completo en su forma WT o por el canal Nav1.5 $\Delta$ PDZ (Figura V.47).

Resultados similares se obtuvieron cuando se cotransfectó el Nter conjuntamente con los canales Kir2.2. De hecho, la densidad de la  $I_{Kir2.2}$  registrada en células cotransfectadas con el Nter resultó ser significativamente mayor que la registrada en ausencia del fragmento y prácticamente idéntica a la registrada en presencia de los canales Nav1.5 completos (Figura V.47). Por el contrario, la cotransfección del Nter con los canales Kir2.3 no produjo ninguna modificación significativa en la  $I_{Kir2.3}$  (Figuras V.46B y V.47), de forma similar a lo observado al cotransfectar el canal Nav1.5 completo.

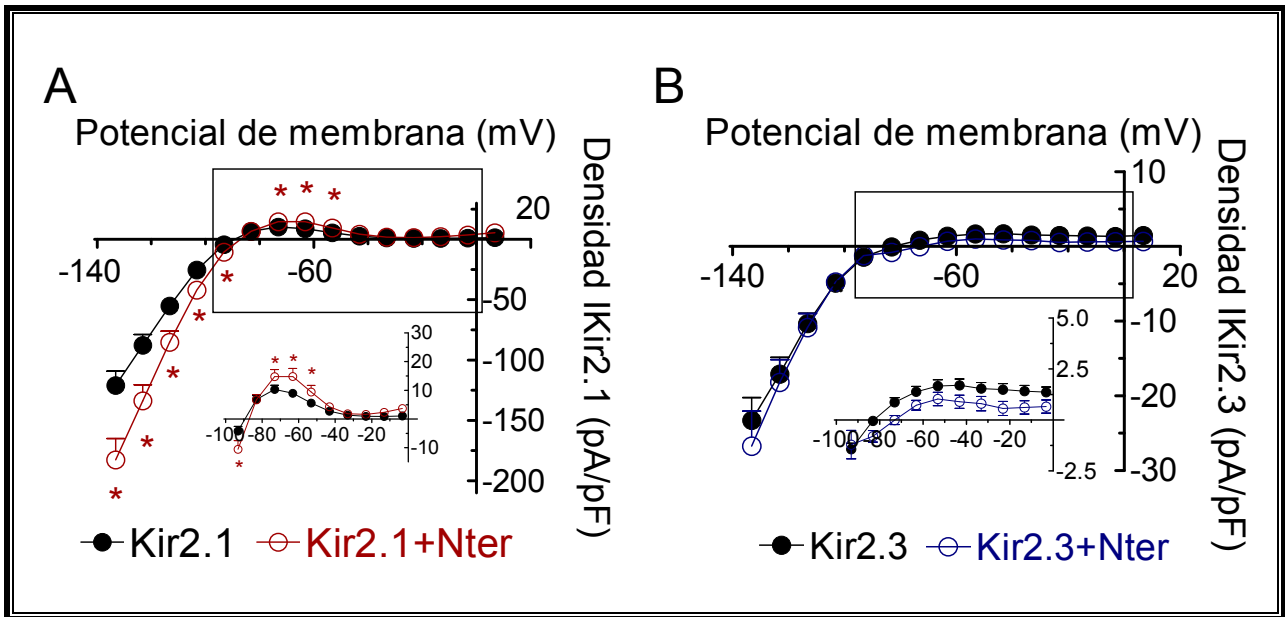


Figura V.46. El extremo Nter del canal Nav1.5 determina la interacción positiva Nav1.5-Kir2.1. (A) y (B) Media de las relaciones densidad de corriente-voltaje para  $I_{Kir2.1}$  (A) e  $I_{Kir2.3}$  (B) registradas en células CHO expresando canales Kir2.1 o Kir2.3 solos, o cuando se cotransfectaban con Nter, respectivamente. En (A), \*  $P < 0.05$  frente a Kir2.1 o solo (ANOVA seguido del test de Newman-Keuls y un modelo multinivel de efectos mixtos). Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de  $> 25$  experimentos/células.

Por tanto, estos resultados sugerían que el aumento de la  $I_{Kir2.1/2.2}$  producido por la coexpresión del canal Nav1.5 eran completamente atribuibles a su dominio N-terminal.

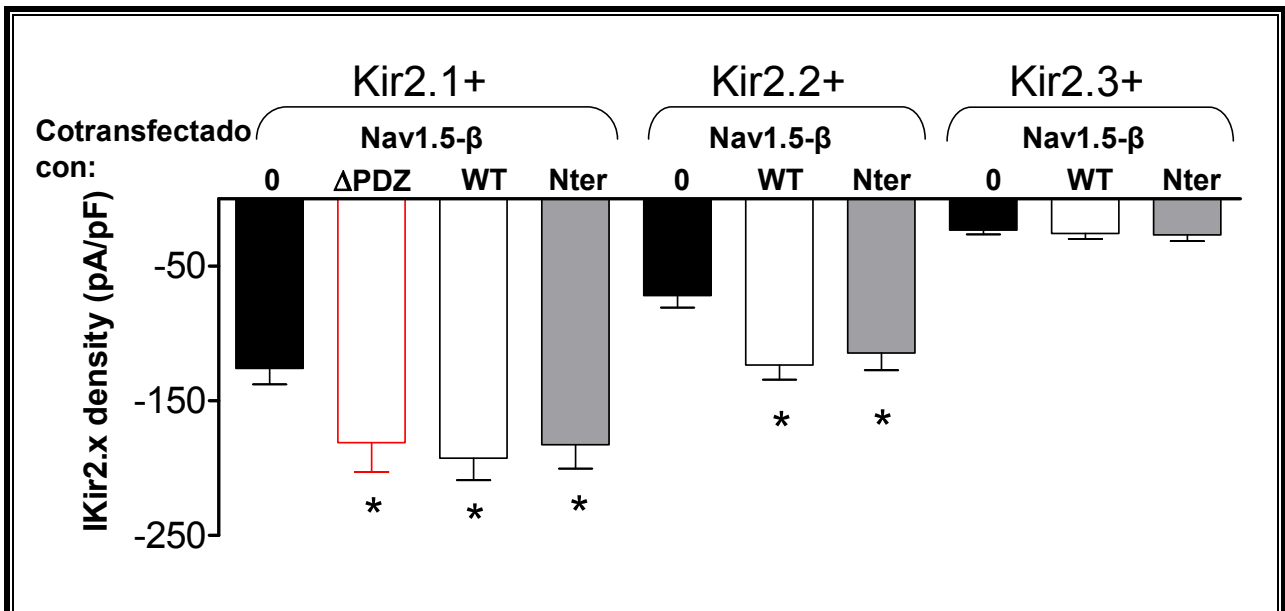
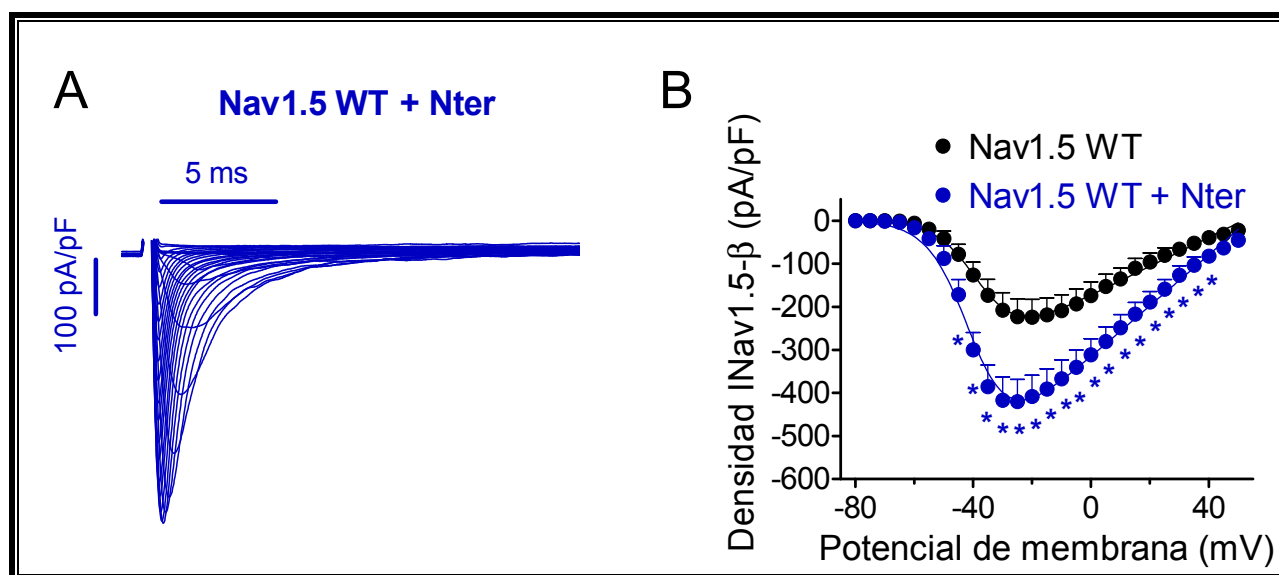


Figura V.47. El extremo Nter del canal Nav1.5 aumenta la densidad de la  $I_{Kir2.1}$  e  $I_{Kir2.2}$ , pero no de  $I_{Kir2.3}$ . Densidad de  $I_{Kir2.x}$  medida a  $-120$  mV en células CHO transfectadas con los canales Kir2.x solos o junto con canales Nav1.5 WT completos o con el fragmento Nter. En el caso de  $I_{Kir2.1}$  también se incluyen los resultados obtenidos al cotransfectar con Nav1.5 $\Delta$ PDZ. \*  $P < 0.05$  frente a Kir2.1 o Kir2.2 solo (ANOVA seguido del test de Newman-Keuls y un modelo multinivel de efectos mixtos). Cada barra representa la media  $\pm$  EEM de  $> 25$  experimentos/células.

A continuación, analizamos los efectos del fragmento Nter sobre la  $I_{Nav1.5}$  registrada en células CHO. Como se puede observar en la Figura V.48, la cotransfección del Nter aumentó significativamente la densidad de la  $I_{Nav1.5}$ , alcanzando prácticamente un 100% de aumento en nuestras condiciones experimentales. Por el contrario, no se observaron modificaciones significativas en las propiedades tiempo- o voltaje-dependientes de la corriente.

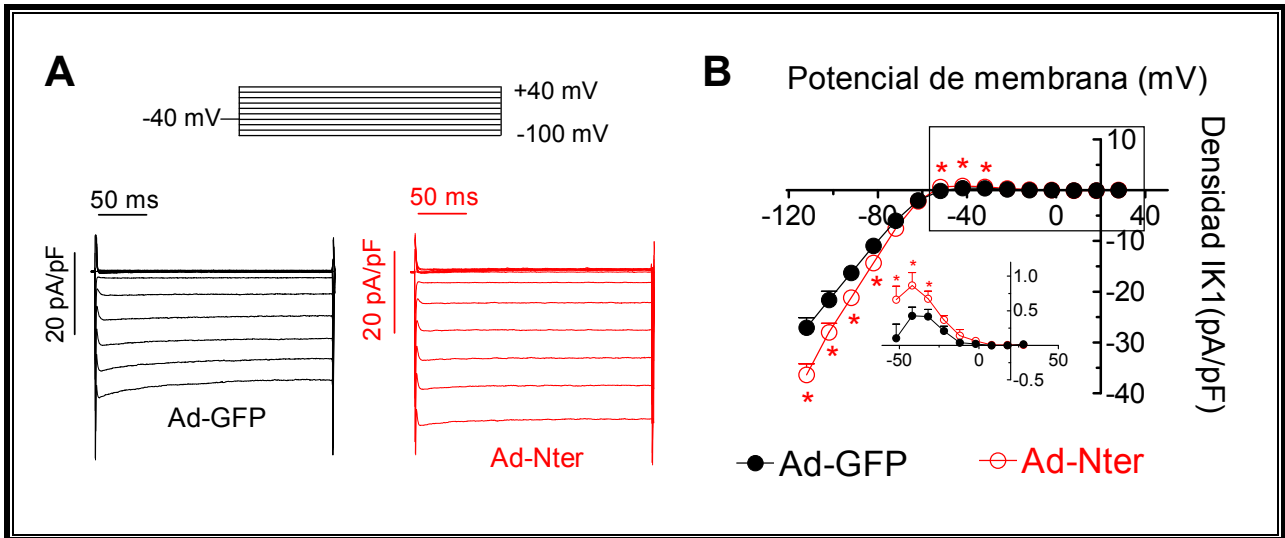
Estos resultados confirmaban los obtenidos anteriormente por Clatot y colaboradores (Clatot y cols., 2012). Por otro lado, es interesante destacar que el Nter no modificaba la densidad de corriente generada por los canales Nav1.5 $\Delta$ PDZ, lo que sugería que para que este fragmento aumente la densidad de la  $I_{Nav1.5}$  es necesario que los canales Nav1.5 tengan el extremo C-terminal intacto para poder unirse a la  $\alpha$ 1-sintrofina.



**Figura V.48.** El extremo Nter del canal Nav1.5 aumenta la densidad de la  $I_{Nav1.5}$ . **(A)** Familia de trazos  $I_{Nav1.5}$  cotransfectando Nav1.5 y Nter registrados en una célula CHO tras aplicar un protocolo de pulsos de 50 ms de duración desde  $-80$  mV hasta  $+50$  mV en incrementos de 5 mV (potencial de fijación =  $-120$  mV). **(B)** Relaciones densidad de corriente – voltaje medias construidas a partir de registros de  $I_{Nav1.5}$  medidos en células CHO transfectadas con los canales Nav1.5 solos o junto con el fragmento Nter. \*  $P < 0.05$  frente a Nav1.5 solo (ANOVA seguido del test de Newman-Keuls y un modelo multinivel de efectos mixtos). Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de  $> 15$  experimentos/células.

### 5.2.2. Efectos del Nter en miocitos ventriculares de rata

Para comprobar si el péptido Nter, por sí solo, podía promover la expresión de los canales Kir2.1-2.2 y Nav1.5 en miocitos ventriculares de rata adulta, se sobreexpresó Nter en estas células utilizando un adenovirus que codificaba para este fragmento (Ad-Nter). En este grupo de

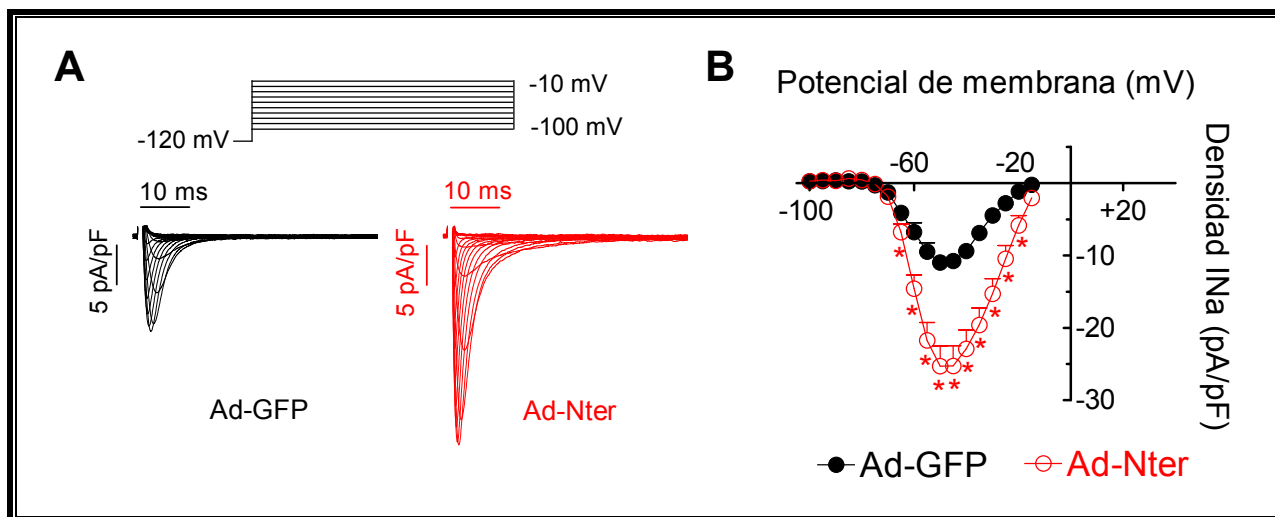


**Figura V.49. El fragmento Nter aumenta las densidad de la  $I_{K1}$  en miocitos ventriculares de rata.** (A) Familias de trazos de  $I_{K1}$  registrados utilizando el protocolo de pulsos que se muestra en la parte superior de la figura en miocitos ventriculares de rata infectados con Ad-GFP (izquierda) o Ad-Nter (derecha). (B) Relaciones densidad de corriente-voltaje medias para la  $I_{K1}$  registrada en miocitos ventriculares de rata infectados con Ad-GFP o Ad-Nter. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de  $> 12$  experimentos/miocitos procedentes de 3 ratas. \*  $P < 0.05$  frente a Ad-GFP (ANOVA seguido del test de Newman-Keuls y un modelo multinivel de efectos mixtos).

experimentos, se utilizaron como control negativo miocitos infectados con un adenovirus que codificaba únicamente para GFP (Ad-GFP). La infección con el Ad-Nter no modificó significativamente la capacitancia de los miocitos ventriculares ( $76.5 \pm 3.9$  vs  $74.0 \pm 5.6$  pF,  $P > 0.05$ ;  $n \geq 18$ ). Las Figuras V.49A y 49B demuestran que la densidad de la  $I_{K1}$  en los miocitos infectados con el Ad-Nter era significativamente mayor que en los miocitos infectados con Ad-GFP a potenciales negativos (entre -100 y -70 mV) y positivos (entre -40 y -20 mV) al  $E_K$ .

Las Figuras V.50A y 50B muestran que la infección con Ad-Nter produjo un marcado aumento de la densidad de la  $I_{Na}$ , sin producir cambios significativos en las características tiempo- o voltaje dependientes. Estos resultados demuestran que el fragmento Nter aumenta la  $I_{K1}$  y la  $I_{Na}$  en miocitos ventriculares de rata, confirmando que ejerce un “efecto chaperona” sobre los canales que generan dichas corrientes en una célula cardiaca, lo que refuerza su relevancia fisiológica.

Todos estos resultados confluyen en la idea de que el dominio N-terminal de los canales Nav1.5 es el responsable de la modulación positiva tanto de los canales Nav1.5 como de los canales Kir2.1-2.2. Por lo tanto, para que la modulación positiva ocurra, tanto el extremo N-terminal de Nav1.5 como el extremo C-terminal de los canales Nav1.5 o Kir2.1-2.2 deben unirse a una proteína PDZ.



**Figura V.50. El fragmento Nter aumenta la densidad de la  $I_{Na}$  en miocitos ventriculares de rata.** (A) Familias de trazos de  $I_{Na}$  registrados utilizando el protocolo de pulsos que se muestra en la parte superior de la figura en miocitos ventriculares de rata infectados con Ad-GFP (izquierda) o Ad-Nter (derecha). (B) Relaciones densidad de corriente-voltaje medias para la  $I_{Na}$  registrada en miocitos ventriculares de rata infectados con Ad-GFP o Ad-Nter. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de  $> 12$  experimentos/miocitos procedentes de 3 ratas. \*  $P < 0.05$  frente a Ad-GFP (ANOVA seguido del test de Newman-Keuls y un modelo multinivel de efectos mixtos).

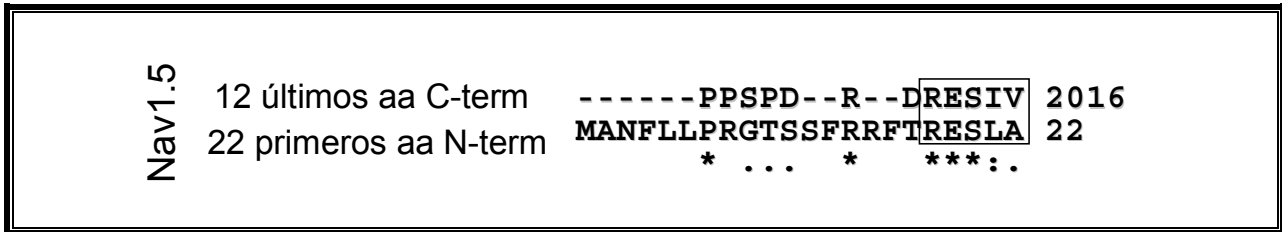
Como se ha demostrado en apartados anteriores, la proteína PDZ que se une a Kir2.1, Kir2.2, Nav1.5, pero no a Kir2.3, es la  $\alpha 1$ -sintrofina. Además, aunque la  $\alpha 1$ -sintrofina únicamente posea un dominio PDZ, se ha demostrado que esta proteína es capaz de formar dímeros entre sí a través de los dominios PH2 y SU (Kachinsky y cols., 1999). Nuestra hipótesis se basa en que este dímero tiene dos dominios PDZ accesibles para, por un lado, unirse al extremo N-terminal de Nav1.5 y, por otro lado, a la secuencia de unión a PDZ situada en el extremo C-terminal de los canales Kir2.1, Kir2.2 o Nav1.5, aunque la estequiometría del complejo proteico no ha podido desenmascarse hasta el momento.

## 6. DETERMINANTES MOLECULARES DEL “EFECTO CHAPERONA” DEL Nter

Los resultados obtenidos en apartados anteriores demostraban que el dominio N-terminal del canal Nav1.5 aumentaba la densidad de la corriente generada por los canales Kir2.1, Kir2.2 y Nav1.5 siempre y cuando éstos tres últimos se unieran a la  $\alpha 1$ -sintrofina a través de su extremo C-terminal. Este hecho sugiere, por tanto, que el dominio N-terminal debería unirse a su vez a la  $\alpha 1$ -sintrofina. Examinando el dominio N-terminal de los canales Nav1.5, se puede apreciar que entre los residuos 18 y 22 hay una secuencia que cumple los requisitos establecidos para la secuencia

## Resultados

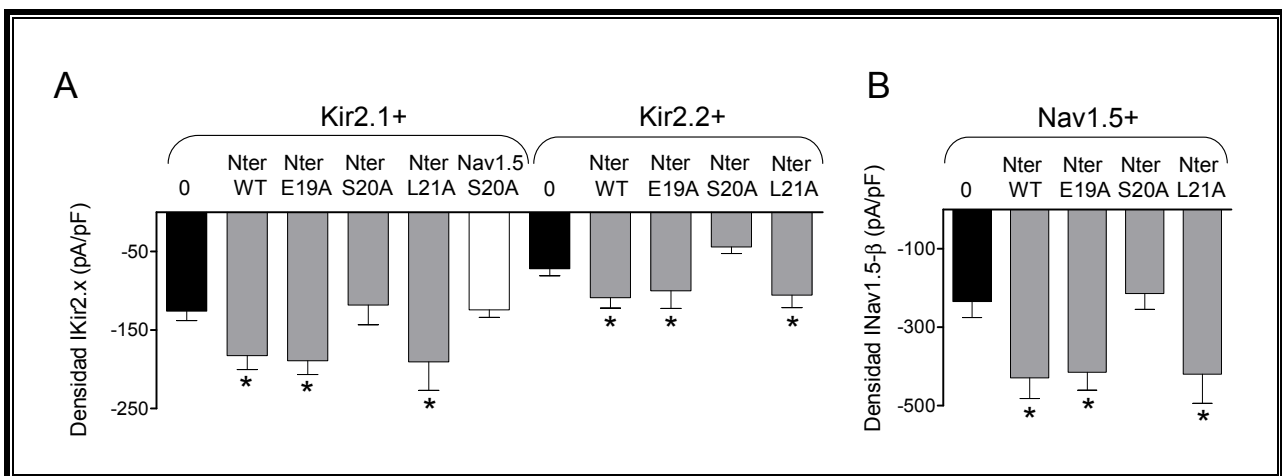
consenso (R/K-E-S/T-X-V-COOH) de los motivos de unión a dominios PDZ tipo I (Leonoudakis y cols., 2001, 2004a y 2004b; Tonikian y cols., 2008; Ivarsson, 2012). De hecho, como se muestra en la Figura V.51, dicha secuencia es muy similar a la del motivo de unión a dominios PDZ situada en el extremo C-terminal de Nav1.5.



**Figura V.51. El extremo N-terminal posee un motivo de unión a dominios PDZ.** Secuencia de los últimos 12 y los primeros 22 residuos de los canales Nav1.5 cardiacos humanos. El recuadro indica el motivo de unión a dominios PDZ en el C-terminal y el identificado en el Nter; “\*”, residuos idénticos en ambas secuencias; “:”, residuos con propiedades muy similares; “.” residuos que comparten cierta similitud.

### 6.1 Papel de la secuencia RESLA en el “efecto chaperona”

Para determinar el papel de esta secuencia identificada en el extremo N-terminal en el aumento de la  $I_{Na}$  y la  $I_{K1}$  producido por el Nter, realizamos experimentos de mutagénesis dirigida, y se mutaron las bases que codificaban para los residuos Glu19 (p.E19A), Ser20 (p.S20A) o Leu21

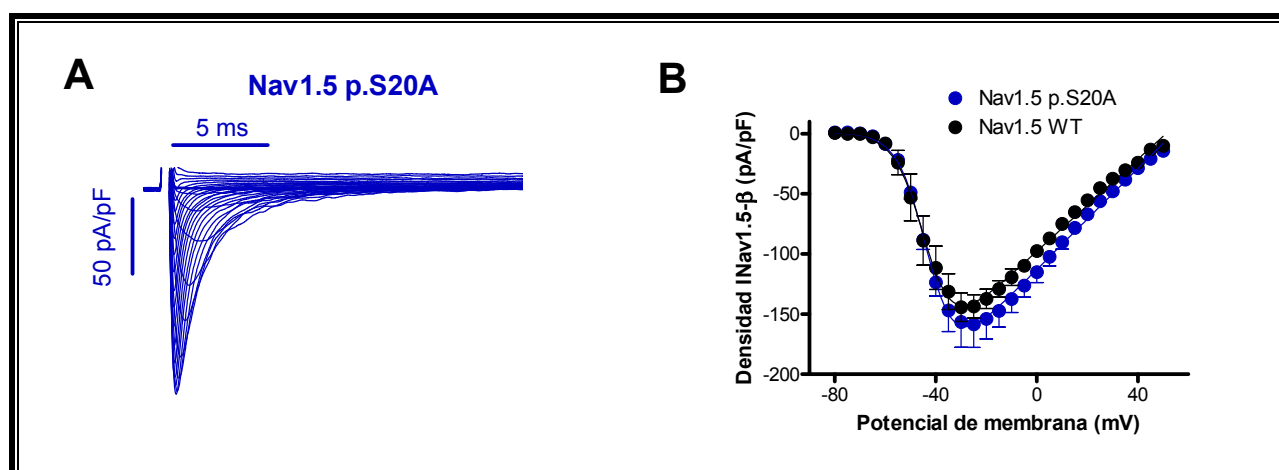


**Figura V.52. La serina en posición 20 determina el “efecto chaperona” del fragmento Nter de Nav1.5.** (A) Densidad de  $I_{Kir2.x}$  registrada a -120 mV en células CHO transfectadas con canales Kir2.1 o Kir2.2 solos o junto con el fragmento Nter en su forma WT o con las mutaciones indicadas. La barra blanca representa la densidad de la  $I_{Kir2.1}$  registrada en células transfectadas con canales Kir2.1 WT conjuntamente con el canal Nav1.5 completo en el que se había sustituido el residuo Ser20 por Ala. \*  $P < 0.05$  frente a Kir2.x solo. (B) Densidad máxima de  $I_{Nav1.5-\beta}$  en células transfectadas con Nav1.5- $\beta$  solo o junto con el fragmento Nter en su forma WT o con las mutaciones indicadas. \*  $P < 0.05$  frente a Nav1.5- $\beta$  solo. Cada barra representa la media  $\pm$  EEM de  $>25$  experimentos/células (ANOVA seguido de un test de Newman-Keuls y un modelo multinivel de efectos mixtos).

(p.L21A) en el plásmido que codificaba para el fragmento Nter. A continuación, se registraron la  $I_{Kir2.x}$  y la  $I_{Nav1.5}$  en células CHO cotransfectadas con los canales correspondientes y las distintas construcciones del fragmento Nter.

En la Figura V.52A se muestran las densidades medias de  $I_{Kir2.1}$  e  $I_{Kir2.2}$  registradas a  $-120$  mV al cotransfectar el fragmento Nter en su forma WT o con las distintas mutaciones (p.E19A, p.S20A, p.L21A). Como se puede observar, en ambos casos la cotransfección de los fragmentos Nter p.E19A y p.L21A produjo un aumento similar al que producía la forma WT, sin embargo, la sustitución de la Ser20 por Ala suprimía completamente el aumento producido por el fragmento Nter. A continuación, quisimos determinar si la sustitución de este residuo en el canal Nav1.5 completo (Nav1.5 p.S20A) tendría las mismas consecuencias. Por tanto, estos resultados demuestran que la serina en posición 20 del fragmento Nter es crítica para el aumento de la  $I_{Kir2.x}$ .

En primer lugar, registramos la corriente generada por los canales Nav1.5 p.S20A en células CHO, lo que nos permitió comprobar que la mutación de esta serina no producía cambios significativos en sus propiedades electrofisiológicas, de tal forma que la densidad, la dependencia de tiempo y de voltaje de la activación e inactivación fueron idénticas a las de la corriente generada por canales Nav1.5 WT (Figura V.53).

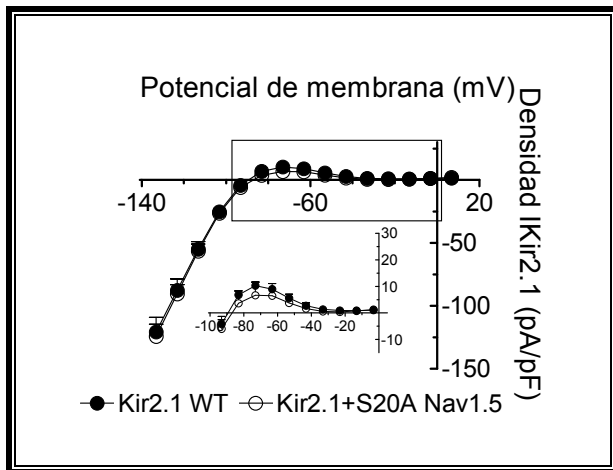


**Figura V.53. Nav1.5 p.S20A no presenta cambios electrofisiológicos con respecto a Nav1.5 WT.** (A) Familia de trazos de  $I_{Nav1.5S20A}$  registrados en una célula CHO tras aplicar un protocolo de pulsos de 50 ms de duración desde  $-80$  mV hasta  $+50$  mV en incrementos de 5 mV (potencial de fijación =  $-120$  mV). (B) Relaciones densidad de corriente – voltaje medias construidas a partir de registros de  $I_{Nav1.5}$  medidos en células CHO transfectadas con los canales Nav1.5 solos o Nav1.5 p.S20A. (ANOVA seguido del test de Newman-Keuls y un modelo multinivel de efectos mixtos). Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de  $> 15$  experimentos/células.

Sin embargo, tal y como se puede observar en las Figuras V.52A y V.54, la cotransfección de Kir2.1 con Nav1.5 p.S20A no modificó la densidad de la  $I_{Kir2.1}$  respecto a la de la corriente generada al transfectar los canales Kir2.1 en solitario. Por tanto, todos estos resultados demuestran que la

## Resultados

serina en posición 20 del dominio N-terminal de Nav1.5 es crítica para el aumento de la  $I_{Kir2.x}$  promovido tanto por el fragmento Nter como por el canal Nav1.5 completo. Por su parte, en la Figura V.52B se muestra la densidad de la  $I_{Nav1.5-\beta}$  registrada en células CHO transfectadas con Nav1.5+ $\beta$  y cada una de las construcciones del Nter. Es importante destacar que al igual que había ocurrido en la  $I_{Kir2.x}$ , el fragmento Nter p.S20A no era capaz de aumentar la  $I_{Nav1.5-\beta}$ , mientras que p.E19A y p.L21A produjeron un aumento idéntico al observado con el fragmento Nter WT.

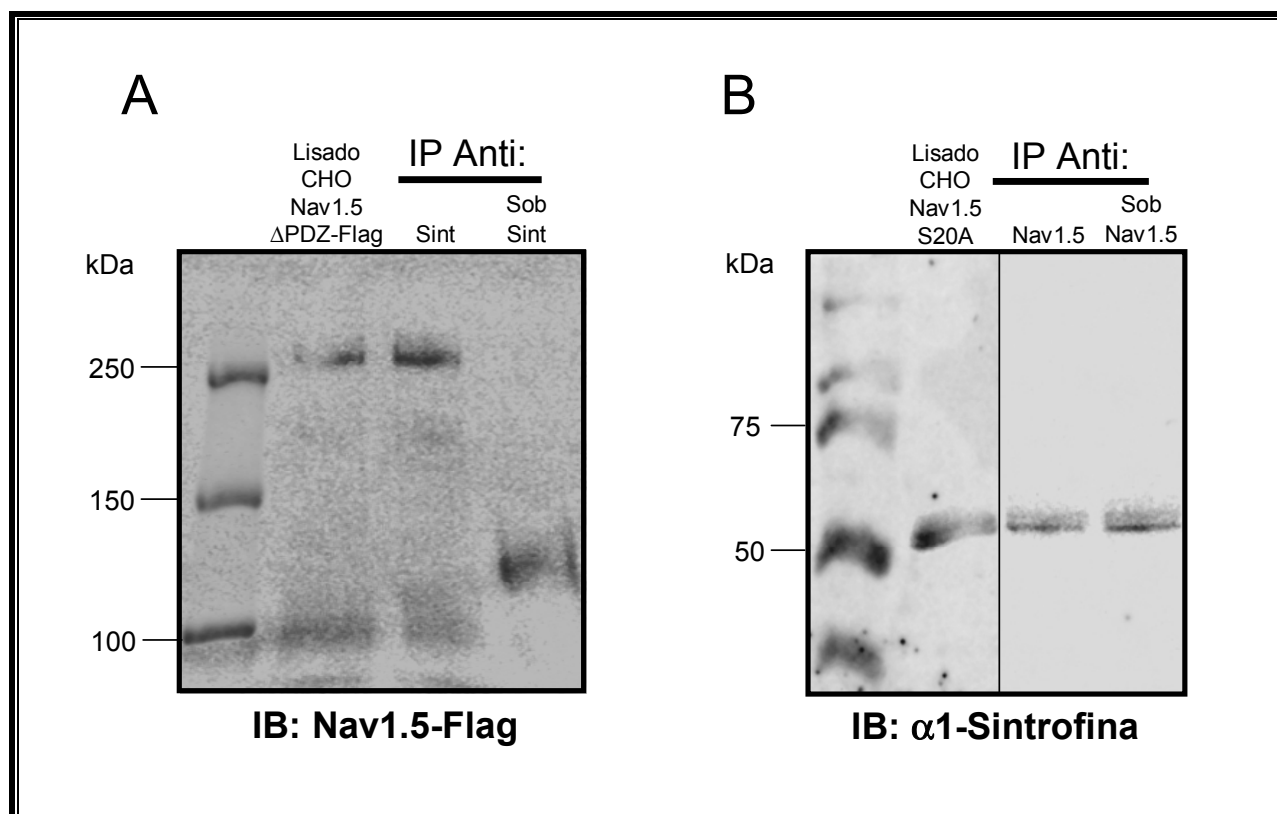


**Figura IV.54. El canal Nav1.5 p.S20A no incrementaba la  $I_{Kir2.1}$ .** Relaciones densidad de corriente-voltaje medias de  $I_{Kir2.1}$  registrada en células transfectadas con canales Kir2.1 solos o cotransfectadas con el canal Nav1.5 p.S20A. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de  $> 16$  experimentos/células (ANOVA seguido de un test de Newman-Keuls y un modelo multinivel de efectos mixtos).

## 6.2. Estudios de interacción de $\alpha 1$ -sintrofina con los dominios de unión a PDZ de Nav1.5

Los resultados mostrados en apartados anteriores demuestran que la  $\alpha 1$ -sintrofina es la proteína de anclaje que determina la modulación recíproca positiva Nav1.5-Kir2.1/2.2. Por otra parte hemos propuesto que el canal Nav1.5 podría unirse a proteínas con dominios PDZ a través de su motivo canónico (SIV) localizado en el extremo C-terminal y a través de un motivo localizado en el dominio N-terminal, en el que la serina en posición 20 es crítica.

A continuación realizamos ensayos de co-inmunoprecipitación para confirmar que los canales Nav1.5 pueden unirse a la  $\alpha 1$ -sintrofina a través de ambos motivos de unión a dominios PDZ. La Figura V.55A demuestra que en células CHO el canal Nav1.5 $\Delta$ PDZ fue detectado en el complejo correspondiente a la co-inmunoprecipitación con la  $\alpha 1$ -sintrofina y no en el sobrenadante. Para confirmar este resultado, se hizo el experimento inverso, que demostró que la  $\alpha 1$ -sintrofina se detectaba en el complejo de la co-inmunoprecipitación con el canal Nav1.5 $\Delta$ PDZ (Figura V.56A). Por tanto, estos resultados demuestran que la  $\alpha 1$ -sintrofina podía interactuar con el canal Nav1.5, a pesar de haber suprimido su motivo de unión a dominios PDZ canónico del extremo C-terminal.



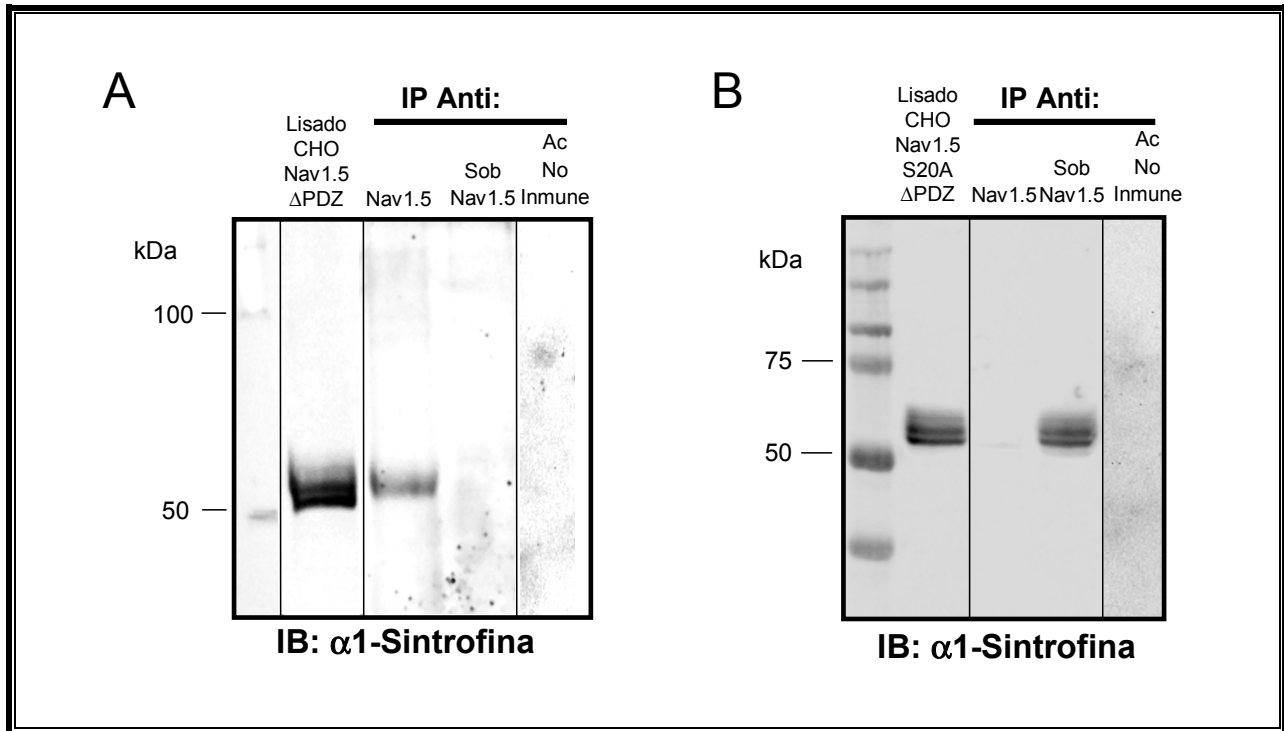
**Figura V.55. El canal Nav1.5 interacciona con la  $\alpha$ 1-sintrofina a través de motivos de unión a PDZ situados en los dominios N- y C-terminales.. (A) El canal Nav1.5 $\Delta$ PDZ inmunoprecipita con la  $\alpha$ 1-sintrofina. El canal Nav1.5 $\Delta$ PDZ-Flag fue detectado mediante *western blot* en lisados de células CHO ( $n = 3$  de tres placas diferentes). (B) La sustitución de la serina 20 en el canal Nav1.5 reduce su interacción con la  $\alpha$ 1-sintrofina. El canal Nav1.5 p.S20A-Flag fue detectado mediante *western blot* en lisados de células CHO ( $n = 3$  de tres placas diferentes). En ambos casos también se muestra el sobrenadante (Sob) recuperado después de la centrifugación. Se utilizaron preparaciones enriquecidas de membrana de lisados de células CHO en todas las reacciones de inmunoprecipitación. Ambos lisados y sus correspondientes co-inmunoprecipitaciones fueron cargados en el mismo gel y los carriles fueron separados (líneas continuas) sólo cuando se incubaron con un anticuerpo secundario distinto: se utilizó anticuerpo secundario conjugado con HRP para detectar la proteína en los lisados (*western blot* normal) y Proteína A conjugada con HRP para las co-inmunoprecipitaciones. IB, anticuerpo utilizado para *immunoblotting*; IP, anticuerpo utilizado para inmunoprecipitación.**

Por su parte, en la Figura V.55B se muestran los resultados obtenidos al realizar el ensayo de co-inmunoprecipitación entre  $\alpha$ 1-sintrofina y el canal Nav1.5 p.S20A en células CHO. Como se puede observar la  $\alpha$ 1-sintrofina se detectaba tanto en el carril correspondiente a la co-inmunoprecipitación como en el del sobrenadante, dando a entender que la sustitución de la Serina en posición 20 únicamente suprimía la unión del canal a través del motivo de unión a dominios PDZ situada en el dominio N-terminal con una parte de la  $\alpha$ 1-sintrofina, pudiendo el resto unirse al canal a través del motivo del extremo C-terminal.

Para confirmar esta hipótesis, se construyó un canal Nav1.5 en el que se suprimieron ambos motivos (Nav1.5 $\Delta$ PDZ p.S20A) y se realizó un ensayo de co-inmunoprecipitación en células CHO.

## Resultados

La Figura V.56B muestra que la  $\alpha$ 1-sintrofina no co-inmunoprecipitaba con el canal Nav1.5 $\Delta$ PDZ p.S20A demostrando que al eliminar los motivos de unión a dominios PDZ del canal Nav1.5, se abole la interacción con la  $\alpha$ 1-sintrofina.



**Figura V.56. La  $\alpha$ 1-sintrofina inmunoprecipita con el canal Nav1.5 $\Delta$ PDZ pero no con el canal Nav1.5 $\Delta$ PDZ p.S20A.** La  $\alpha$ 1-sintrofina inmunoprecipita con Nav1.5 $\Delta$ PDZ (**A**) ( $n = 3$  de 3 placas diferentes) pero no con los canales S20A Nav1.5 $\Delta$ PDZ (**B**) ( $n = 3$ , de tres placas diferentes). La  $\alpha$ 1-sintrofina fue detectada por *western blot* en lisados de células CHO. Para las reacciones de inmunoprecipitación se utilizaron preparaciones enriquecidas de membrana. También se muestran los sobrenadantes (Sob) recuperados después de la centrifugación de las co-inmunoprecipitaciones. Como control negativo, se utilizaron los lisados tratados con una IgG no específica (y proteína A/G) (carril “Ac no Inmune”). Ambos lisados y sus correspondientes co-inmunoprecipitaciones fueron cargados en el mismo gel y los carriles fueron separados (líneas continuas) sólo cuando se incubaron con un anticuerpo secundario distinto: en este caso se utilizó anticuerpo secundario conjugado con HRP para detectar la proteína en los lisados (*western blot* normal) y Proteína A conjugada con HRP para las co-inmunoprecipitaciones. IB, anticuerpo utilizado para *immunoblotting*; IP, anticuerpo utilizado para inmunoprecipitación.

Estos resultados demuestran que además del dominio de unión a PDZ canónico que se encuentra en el extremo C-terminal, hay una secuencia interna de unión a PDZ que se encuentra en el extremo N-terminal del canal Nav1.5, que media la unión de este canal con la  $\alpha$ 1-sintrofina. Los análisis hechos mediante electrofisiología y co-inmunoprecipitación demuestran que la unión a  $\alpha$ 1-sintrofina viene determinado tanto por la serina en posición 20 como por los tres últimos aminoácidos del canal Nav1.5 (SIV).

## **VI. Discusión**

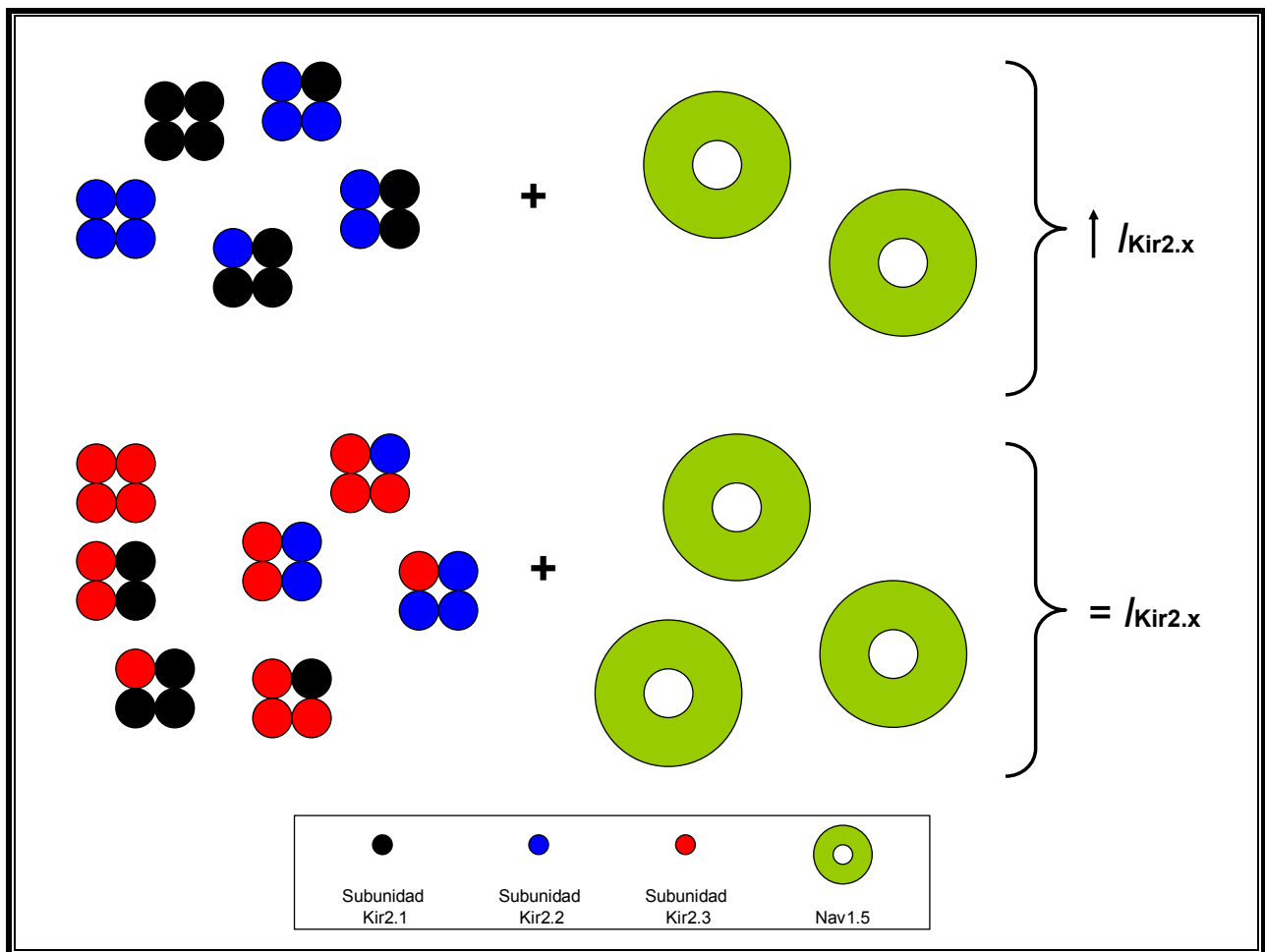


## 1. EFECTOS DE LA EXPRESIÓN DE Nav1.5- $\beta$ SOBRE LOS CANALES Kir2.x

### 1.1. La expresión de Nav1.5- $\beta$ incrementa $I_{Kir2.1}$ e $I_{Kir2.2}$ pero no $I_{Kir2.3}$

Los resultados de la presente tesis Doctoral demuestran que los canales Nav1.5 asociados a la subunidad auxiliar Nav $\beta$ 1.1 modulan positivamente las densidades de la  $I_{Kir2.1}$  y de la  $I_{Kir2.2}$  pero no de la  $I_{Kir2.3}$ . Más aún, los canales Nav1.5- $\beta$  no aumentan la densidad de las corrientes generadas por los canales heterotetraméricos en los que las subunidades Kir2.3 están presentes (Figura VI.1). Los resultados demostraron además que los canales Kir2.1 y Kir2.2 co-inmunoprecipitan con los Nav1.5 y que los canales Kir2.1 y los Nav1.5 co-localizan en miocito cardiacos de rata. Por el contrario, los canales Kir2.3 no co-inmunoprecipitan con los Nav1.5. El mecanismo por el cual la presencia de una subunidad Kir2.3 en el tetrámero impide la interacción entre los canales Kir2.1, Kir2.2 y Nav1.5 se desconoce actualmente. Pudiera ser que las subunidades Kir2.3 ejercieran un efecto “dominante negativo” de una forma desconocida hasta el momento y que precisaría de un análisis en el futuro. Tanto *in vitro* como *in vivo* se ha demostrado ampliamente que los distintos clones de proteínas Kir2.x son capaces de heterotetramerizar para formar canales funcionales (Preisig-Müller y cols., 2002). Los heterotetrámeros, presentan diferentes propiedades tanto biofísicas como farmacológicas respecto a los homotetrámeros y éstas, a su vez, dependen de qué tipo de subunidades están presentes en el canal (Preisig-Müller y cols., 2002; Caballero y cols., 2010a; Amorós y cols., 2013; Gómez y cols., 2014; Scherer y cols., 2016). Así por ejemplo en la presente tesis Doctoral se ha demostrado que la cinética de activación de los heterotetrámeros que contienen subunidades Kir2.3 es significativamente más lenta que la de los Kir2.1/2.3. Este fenómeno se debe a la lenta cinética de desunión de las poliaminas de su receptor en las subunidades Kir2.3 (Panama y Lopatin, 2006). Con respecto a las propiedades farmacológicas se ha demostrado que tanto la flecainida como la propafenona aumentan la  $I_{K1}$  cuando ésta es generada por homotetrámeros de canales Kir2.1 (Caballero y cols., 2010; Gómez y cols., 2014). La selectividad del efecto se debe a que el sitio receptor para estos fármacos antiarrítmicos viene determinado por el residuo Cis de la posición 311 residuo que es una Ala tanto en canales Kir2.2 como Kir2.3. De hecho, para que se produzca el efecto es imprescindible la presencia de cuatro sitios receptores en las cuatro subunidades Kir2.1 y, por tanto, ni la flecainida ni la propafenona aumentaban la corriente generada por heterotetrámeros aunque estuviesen presentes subunidades Kir2.1 (Caballero y cols., 2010; Gómez y cols., 2014). Estos resultados ponían de manifiesto la importante cooperatividad positiva que se produce entre las subunidades Kir2.x cuando forman canales. Sin embargo, la fosforilación a través de la isoforma  $\beta$  de la proteína cinasa C inhibe las corrientes generadas tanto por

homotetrámeros como por heterotetrámeros en los que participan canales Kir2.2 (Scherer y cols., 2016). Por último, y más importante aún, lo que diferencia a los distintos homo- y heterotetrámeros de canales Kir2.x es su localización preferente en las distintas cámaras cardíacas, lo cual determina las implicaciones fisiopatológicas de los hallazgos de la presente Tesis Doctoral como se verá más adelante.



**FiguraVI.1. La modulación recíproca Kir2.x-Nav1.5 sólo se produce en canales Kir2 con subunidades Kir2.1/Kir2.2.** El aumento de la densidad de la  $I_{Kir2.x}$  producido por la coexpresión de Nav1.5 con los tetrámeros de Kir2.x no sucede cuando los canales contienen al menos una subunidad de Kir2.3.

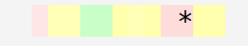
## 2. PAPEL DEL DOMINIO DE UNIÓN A PDZ DE LOS CANALES Kir2.x

### 2.1. La modulación recíproca positiva de los canales Kir2.x depende del motivo de unión a PDZ (SEI)

Milstein y cols. habían sugerido que para que se produjera la modulación recíproca positiva entre canales Nav1.5- $\beta$  y Kir2.1 ambos canales debían interactuar con una proteína de dominio

PDZ (Milstein y cols., 2012). Nuestros resultados demostraban que efectivamente aquellos canales cuya función se modulaban recíprocamente interaccionaban entre sí puesto que co-localizaban y co-immunoprecipitaban, así que era posible que dicha relación estuviera mediada a través de proteínas de dominio PDZ. Dado que la interacción de los dominios de unión a PDZ y los dominios PDZ es altamente selectiva y depende de la secuencia de los dominios de unión exploramos las diferencias en los dominios de unión a PDZ entre canales Kir2.x.

Como se puede observar en la Figura VI.2 los dominios de unión a PDZ de Kir2.1 y Kir2.2 son idénticos (SEI), siendo el de los canales Kir2.3 diferente (SAI), nuestra hipótesis fue que esta diferencia en secuencia de los dominios de unión a PDZ podría ser la responsable de que Nav1.5 no pueda incrementar la densidad de corriente de Kir2.3. Efectivamente, al realizarse experimentos con canales Kir2.x mutantes para el dominio de unión a PDZ, se demostró que el intercambio del dominio de unión a PDZ de los canales Kir2.3 por el de los canales Kir2.1-2.2 (Kir2.3 p.A444E) permitía que los canales Kir2.3 fueran modulados positivamente por los canales Nav1.5-β.

|        |      |   |     | INTERACCIÓN |               |
|--------|------|---|-----|-------------|---------------|
|        |      |   |     | SAP97       | α1-sintrofina |
| Kir2.1 | p.11 | LEPRPLRRESEI  | p.0 | +           | +             |
| Kir2.2 | p.11 | LEQRPYRRESEI  | p.0 | +           | +             |
| Kir2.3 | p.11 | LDNISYRRESAI  | p.0 | +           | +/-           |
| Kir2.6 | p.11 | LEQRPYRRGSEI  | p.0 | ?           | ?             |
| Kir4.1 | p.11 | EGSALSVRISNV  | p.0 | -           | +             |
| Kir6.2 | p.11 | KPKFSISPDSLS  | p.0 | -           | -             |
| TASK   | p.11 | TFRGLMKRRSSV  | p.0 | -           | +             |
| AQP-4  | p.11 | GKDQSGEVLSSV  | p.0 | ?           | +             |
| cons   |      |  |     |             |               |

**Figura VI.2. Secuencias de unión a dominios PDZ de diferentes canales humanos y su capacidad de interacción con SAP97 y α1-sintrofina.** Se puede apreciar el alineamiento de secuencias de los últimos 12 aminoácidos de los extremos C-terminal de cada canal. p.0, último aminoácido antes del carboxi terminal; (+) Se ha demostrado interacción con la proteína PDZ; (-) Se ha demostrado que no hay interacción con la proteína PDZ; (+/-) No hay o es muy débil la interacción con la proteína PDZ; (?) Se desconoce si hay o no interacción. [Datos adaptados de Leonoudakis y cols., 2001, 2004a, 2004b; Neely y cols., 2001]

Más aún, cuando sustituimos el dominio de unión a PDZ de los canales Kir2.1 y Kir2.2 por el de los canales Kir2.3 (Kir2.1 p.E426A y Kir2.2 p.E432A) los canales Kir2.1 y 2.2 no podían ser modulados positivamente por los Nav1.5- $\beta$ . Resaltar también, que el intercambio de la secuencia lineal de los dominios de unión a PDZ entre canales Kir2.1/2.2 y Kir2.3, permitía que los canales Kir2.3 A444E co-inmunoprecipitasen, mientras que los , Kir2.1 p.E426A y Kir2.2 p.E432A dejasen de hacerlo con lo con los canales Nav1.5.

Los experimentos de mutagénesis dirigida demostraron que el aminoácido que resultaba crítico era el antepenúltimo (p.1) del dominio de unión a PDZ. El dominio de unión a PDZ de los canales Kir2.x es de tipo I puesto que el antepenúltimo residuo (p.2) es Ser (Beuckelmann y cols., 1993). Se ha demostrado que el reconocimiento específico de las secuencias lineales cortas por parte de los dominios PDZ depende fundamentalmente de los residuos p.0 y p.2, mientras que el papel de p.1, no parece tan relevante. Por tanto, resulta algo llamativo que la selectividad del efecto de potenciación por parte de los canales Nav1.5 dependa de la presencia del residuo Glu en posición p.1 en los canales Kir2.x. Sin embargo, ya hay datos previos que indican de que algunos dominios PDZ presentan selectividad preferente por ciertos dominios de unión a PDZ en función de los aminoácidos presentes en las posiciones p.1 y p.3 (Karthikeyan y cols., 2001). Más aún, cada vez resulta más evidente que la secuencia de los aminoácidos inmediatamente precedentes al dominio lineal de unión a PDZ modula de forma crítica la afinidad y la selectividad de la unión. En este sentido, es importante resaltar que los residuos que anteceden al dominio de unión a PDZ de los canales Kir2.3 son bastante distintos de los presentes en Kir2.1 y Kir2.2. Por el contrario, estos residuos son idénticos en canales Kir2.1 y Kir2.2 (Figura VI.2).

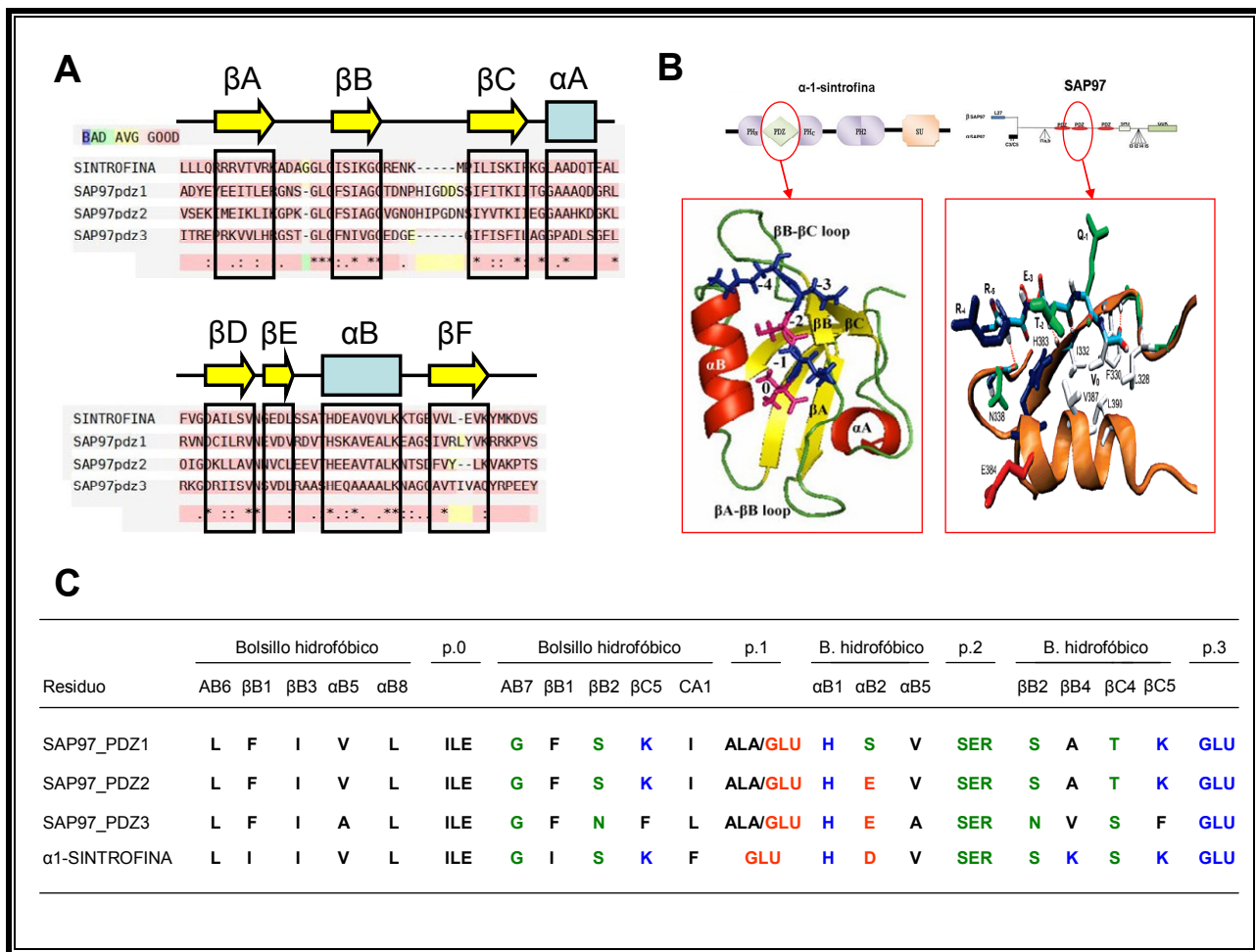
## **2.2. La $\alpha$ 1-sintrofina interacciona con los canales Kir2.1-2.2, pero no con Kir2.3**

Los resultados confirmaban la propuesta hecha por Milstein y cols de que la modulación recíproca positiva entre canales Kir2.1 y Nav1.5- $\beta$  implicaba la unión de el/los canales a una proteína de dominio PDZ. De hecho, estos autores sugerían que dicha proteína era SAP97. Sin embargo, a la luz de nuestros resultados no parecía que la candidata pudiera ser SAP97 puesto que datos previos habían demostrado que las tres isoformas de canales Kir2.x (incluida Kir2.3) se unen a SAP97 (Leonoudakis y cols., 2001, 2004a y 2004b; Vikstrom y cols., 2009). Mas aún, nuestros experimentos de co-inmunoprecipitación llevados a cabo en tejido auricular humano confirmaron que los canales Kir2.3 coinmunoprecipitan con SAP97 y, a la inversa, que SAP97 coinmunoprecipita con SAP97. Los resultados obtenidos con los canales Kir2.1 en los que se

sustituía el dominio lineal SEI por SSV fortalecieron nuestra hipótesis. SSV es la secuencia del dominio de unión a PDZ presente en los canales TASK y Acuarporina-4 (Figura VI.2) y no permite la unión de dichas proteínas a SAP97 pero sí a la  $\alpha 1$ -sintrofina (Leonoudakis y cols., 2001; Neely y cols., 2001). Los resultados demostraron que los canales Kir2.1 SSV eran modulados positivamente por los canales Nav1.5, lo que apoyaba nuestra hipótesis de que la modulación recíproca positiva no dependía de la unión de canales Nav1.5 y Kir2.1/2.2 a SAP97.

Buscábamos por tanto una proteína con dominio PDZ a la que se pudieran unir tanto canales Kir2.1 como Kir2.2 y Nav1.5, pero no los canales Kir2.3. Los experimentos con el mutante Kir2.1-SSV sugerían que, entre otras, la  $\alpha 1$ -sintrofina podría ser una buena candidata. Efectivamente había datos que sugerían que los canales Kir2.3 presentaban una menor afinidad por la  $\alpha 1$ -sintrofina que los Kir2.1-2.2 (Leonoudakis y cols., 2004a). Los experimentos de co-inmunoprecipitación en lisados ventriculares de rata y ratón demostraron que los canales Kir2.1/2.2 interaccionan con la  $\alpha 1$ -sintrofina mientras que los Kir2.3 no lo hacen. Más aún mediante experimentos de mutagénesis dirigida y co-inmunoprecipitación demostramos que los canales Kir2.3 no pueden unirse a la  $\alpha 1$ -sintrofina porque su dominio lineal de unión a PDZ no tiene afinidad por el dominio PDZ de dicha proteína de anclaje. Así, los canales Kir2.1 p.E426A no interaccionan con la  $\alpha 1$ -sintrofina mientras que los canales Kir2.3 en los que su residuo Ala se ha sustituido por el Glu que aparece en canales Kir2.1/2.2 (A444E) si lo hacen.

Como se ha mencionado pequeñas variaciones en la secuencia tanto del dominio PDZ como del ligando lineal puede alterar drásticamente tal interacción con los dominios PDZ (Doyle y cols. 1996; Songyang y cols. 1997; Schultz y cols., 1998; Gee y cols., 2000; Liu y cols., 2007; Kalyoncu y cols., 2010; Shy y cols 2014). Como se puede apreciar en la Figura VI.3B los dominios PDZ generan un bolsillo hidrofóbico en el que se inserta el ligando y éste interacciona principalmente con la hélice  $\alpha B$  y el lazo  $\beta A-\beta B$  (GLGF para SAP97 o GLGI para sintrofina) del dominio PDZ (Gee y cols., 2000; Liu y cols., 2007; Kalyoncu y cols., 2010). En la Figura VI.3C se puede apreciar cómo los residuos  $\beta B1$  y CA1 de los dominios PDZ de sintrofina y SAP97, son distintos para  $\alpha 1$ -sintrofina (I y F, respectivamente) y SAP97 (F e I/L, respectivamente).



**Figura VI.3. La variación de la afinidad de α1-sintrofina y SAP97 por distintos péptidos depende de la secuencia de los dominios PDZ.** (A) Alineamiento y estructura secundaria de los dominios PDZ de sintrofina (1) y SAP97 (3). Flechas amarillas, lámina β; barras azules, α hélice. (B) Representaciones de las estructuras de los dominios PDZ de sintrofina y PDZ2 de SAP97 formando complejos con un ligando (secuencia de unión a dominios PDZ). (C) Posición de los residuos de los dominios PDZ de sintrofina y SAP97 cuya interacción con los péptidos asociados ha sido predicha. Asignación de colores: residuos básicos (azul), residuos ácidos (rojo), residuos hidrofóbicos (negro), residuos sin carga (verde). Todos los residuos de la figura C están conservados en diferentes especies (rata, ratón, hámster, y hombre) [Adaptadas de Doyle y cols., 1996; Songyang y cols., 1997; Kalyoncu y cols., 2010; Liu y cols., 2007]

### 3. PAPEL DE α1-sintrofina y SAP97 EN LA MODULACIÓN RECÍPROCA POSITIVA DE Kir2.x-Nav1.5

#### 3.1. La α1-sintrofina es la responsable de la modulación recíproca positiva de Kir2.x-Nav1.5

Los datos expuestos hasta el momento permitían concluir que los canales que presentan modulación funcional recíproca (Kir2.1, Kir2.2, y Nav1.5) interaccionan entre sí y con la α1-sintrofina. Por el contrario, los canales que no presentan modulación funcional recíproca (Kir2.3 y Nav1.5) ni interaccionan entre sí ni con la α1-sintrofina, aunque sí lo hagan con SAP97. La

confirmación de que la unión a la  $\alpha 1$ -sintrofina era la que determinaba la modulación recíproca funcional la obtuvimos del estudio electrofisiológico en células en las que o la  $\alpha 1$ -sintrofina o SAP97 había sido silenciada. El silenciamiento tanto de SAP97 como de  $\alpha 1$ -sintrofina en células CHO disminuía la densidad de las corrientes  $I_{Kir2.1}$  y  $I_{Nav1.5}$ . Tal y como se discutirá más adelante, estos resultados confirman los descritos por otros autores, demostrando que ambas proteínas de anclaje determinan la presencia de los canales Nav1.5 en la membrana de los miocitos cardíacos (Petitprez y cols., 2011; Milstein y cols., 2012). Por lo que respecta a Kir2.1, existían datos previos demostrando su interacción con ambas proteínas pero no la importancia funcional de la unión a ellas (Vaidyanathan y cols., 2010; Milstein y cols., 2012). Más importante aún, nuestros resultados demuestran que en miocitos cardíacos en los que la  $\alpha 1$ -sintrofina había sido silenciada mediante un shRNA específico vehiculado en una partícula lentiviral que las densidades de la  $I_{Na}$  y la  $I_{K1}$  disminuyen significativamente. Estos datos son la primera demostración de que en el miocardio la presencia de canales Kir2.1 en la membrana depende de la unión a la  $\alpha 1$ -sintrofina.

En las células CHO en las que SAP97 había sido silenciada la modulación recíproca positiva entre canales Nav1.5 y Kir2.1 persiste, por el contrario, el silenciamiento de la expresión de  $\alpha 1$ -sintrofina suprime completamente la modulación recíproca positiva para las dos corrientes. Estos experimentos demostraban que la  $\alpha 1$ -sintrofina es la responsable de la interacción entre canales Nav1.5 y Kir2.1/2.2 que da lugar a su modulación funcional recíproca.

### 3.2. Los canales Kir2.1 y Nav1.5 forman complejos macromoleculares en la membrana

Se sabe que en cardiomiocitos el canal Nav1.5 forma macrocomplejos moleculares con diferentes proteínas (canalomas) en distintas regiones subcelulares. Mediante estudios de inmunofluorescencia, se demostró que existen al menos dos poblaciones de canales Nav1.5 en dos regiones subcelulares distintas: una en las membranas laterales y otra en los discos intercalares (Maier y cols., 2004; Petitprez y cols., 2011; Shy y cols., 2013). Además, el canal Nav1.5 interacciona con distintas proteínas en cada localización. Así, en la membrana lateral, Nav1.5 se asocia con el complejo sintrofina/distrofina (Petitprez y cols., 2011; Shy y cols., 2014). Los canales Nav1.5 localizados en los discos intercalares parecen interaccionar con multitud de proteínas que incluyen la Cx43, la pcp2, la anquirina G, y SAP97 (Sato y cols., 2011; Petitprez y cols., 2011; Noorman y cols., 2013; Makara y cols., 2014; Cerrone y cols., 2014).

Asimismo, varios estudios sugieren que SAP97 colocaliza con los canales Kir2.1 y Kir2.2 en los túbulos T, y con Kir2.1 y Kir2.3 en discos intercalares (Vikstrom y cols., 2009; Vaidyanathan y cols., 2010; Milstein y cols., 2012).

Es decir, que nuestros datos, y los publicados por otros autores previamente, sugerían que los canales Nav1.5 y Kir2.1 podrían estar formando complejos en la membrana en los que estuvieran interaccionando entre sí. Sugerían por tanto que, al menos en algunas localizaciones, los canales Nav1.5 y Kir2.1 podrían formar parte de un único canalosoma. Los ensayos de ligamiento por proximidad (PLA) han demostrado en primicia que, efectivamente, en los miocitos ventriculares de rata, los canales Nav1.5 y Kir2.1 están separados por una distancia inferior a 40 nm.

#### **4. LOS CANALES Kir2.x y Nav1.5 NO INTERACCIONAN EN LA AURÍCULA HUMANA**

##### **4.1. Implicaciones fisiopatológicas de la interacción entre canales Kir2.1/2.2 y Nav1.5**

Los canales homotetraméricos formados por las subunidades Kir2.1 son probablemente los principales responsables de generar la  $I_{K1}$  en miocitos ventriculares humanos (Gaborit y cols., 2007) (Wang y cols., 1998; Lopatin y Nichols, 2001; Gaborit y cols., 2007; Anumonwo y Lopatin, 2010), Por el contrario, en el tejido auricular humano la presencia de las proteínas Kir2.2 y Kir2.3 es significativamente mayor que en el tejido ventricular (Gaborit y cols., 2007). De hecho, las características biofísicas (intensidad de la rectificación y cinética de activación) y farmacológicas de la  $I_{K1}$  auricular humana demuestran que en los canales que la generan aparecen subunidades Kir2.3 (Caballero y cols., 2010a, Amorós y cols., 2013, Gómez y cols., 2014)

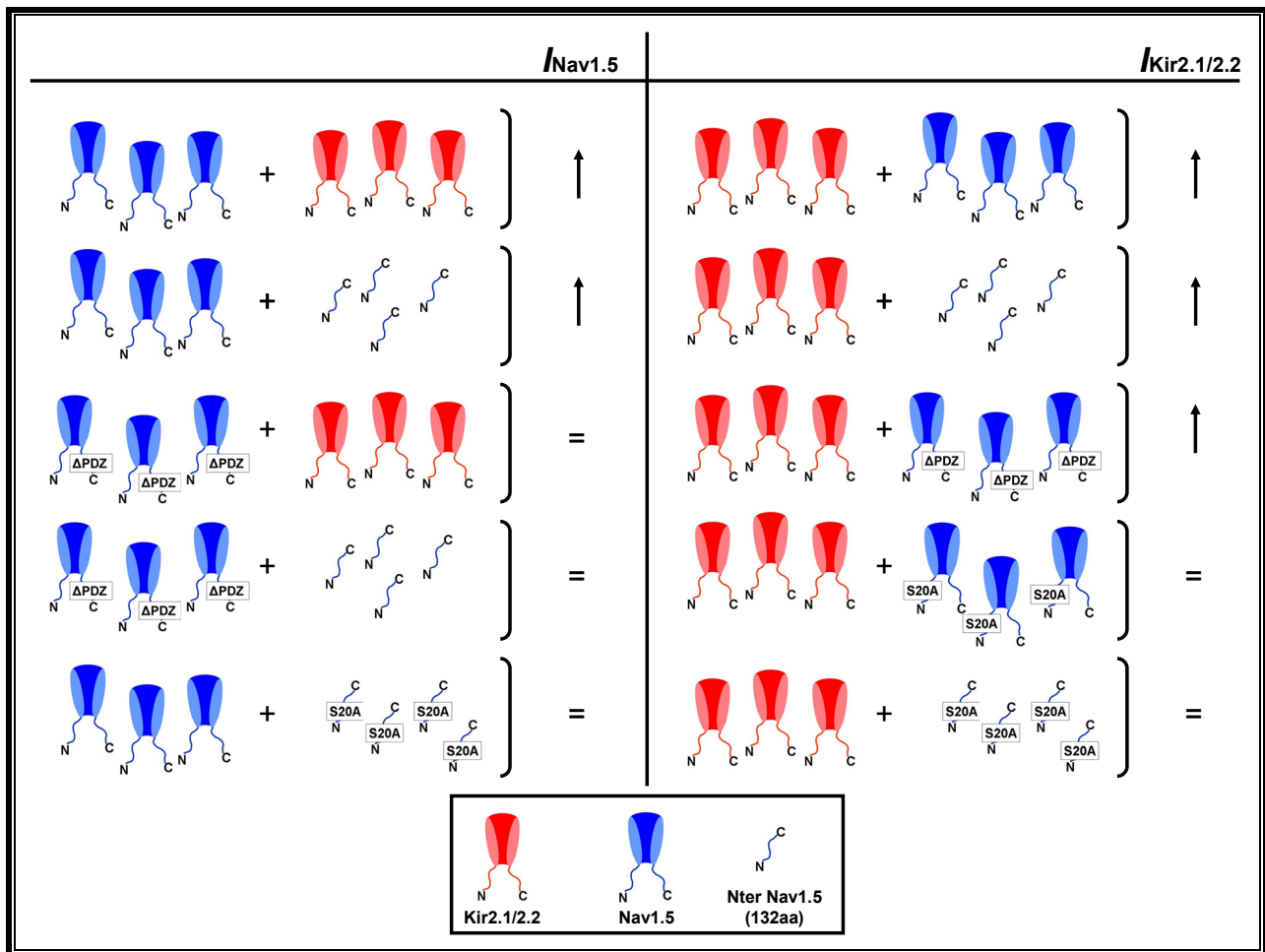
La selectividad en la modulación funcional positiva entre los canales Kir2.1/2.2 con Nav1.5 pero no con los Kir2.3, podría tener implicaciones fisiológicas, así como consecuencias clínicas. Basándonos en nuestros resultados planteamos la hipótesis de que en la aurícula humana no existirá una modulación recíproca positiva entre la  $I_{Na}$  y la  $I_{K1}$ . Como se ha mencionado en la introducción, como consecuencia del remodelado eléctrico que caracteriza a la FAC, en tejido auricular se produce un aumento significativo de la densidad de la  $I_{K1}$  (Voigt y cols., 2010; Gonzalez de la Fuente y cols., 2013) que es debido al incremento de la expresión de canales Kir2.1 y Kir2.3 (Voigt y cols., 2010; Martins y cols., 2014). Confirmando nuestra hipótesis, los resultados de la presente Tesis Doctoral demostraron en miocitos auriculares procedentes de pacientes con FAC que el aumento de la densidad de la  $I_{K1}$  no se acompaña de un aumento de la densidad de la  $I_{Na}$ . Más aún, hemos confirmado en muestras auriculares humanas que los canales Kir2.3 se unen con alta afinidad a SAP97 (Vikstrom y cols., 2009), pero que dicha unión no es condición suficiente para la regulación entre Nav1.5 y Kir2.3. De hecho, a pesar de la unión de los canales Kir2.3 a SAP97 ni modulan ni son modulados positivamente por los canales Nav1.5.

Por el contrario, proponemos que cualquier cambio de expresión de los canales Nav1.5 o Kir2.1 en el tejido ventricular humano sí se verá acompañado de la modulación recíproca de las corrientes  $I_{K1}$  e  $I_{Na}$ , respectivamente. Tal sería el caso de pacientes con insuficiencia cardiaca terminal o con cardiomiopatía dilatada, en los que se ha descrito que se produce una disminución significativa de la expresión de los canales Kir2.1 que es la responsable de la disminución de la  $I_{K1}$  ventricular (Beuckelmann y cols., 1993; Koumi y cols., 1995a). También proponemos que en aquellos pacientes que tienen síndromes arritmogénicos primarios debidos a mutaciones que producen la pérdida de función de los canales Nav1.5 o Kir2.1 (como el SBr o el SAT, respectivamente) se producirá de forma concomitante una disminución en la densidad de la  $I_{K1}$  o la  $I_{Na}$ , respectivamente.

## 5. PAPEL DE LOS EXTREMOS N- Y C-TERMINALES DE Nav1.5 SOBRE LA MODULACIÓN DE CANALES Kir2.x

Experimentos previos de *pull-down* utilizando el péptido que contenía los últimos 66 aminoácidos del extremo C-terminal de Nav1.5 fusionados con glutation-S-transferasa, sugerían que los canales Nav1.5 interaccionaban a través la secuencia lineal de unión a PDZ (SIV) C-terminal con la  $\alpha 1$ -sintrofina (Gavillet y cols., 2006). Sin embargo, en la presente Tesis Doctoral demostramos que los canales Nav1.5 a los que se suprime dicha secuencia (Nav1.5 $\Delta$ PDZ) inmunoprecipitan con la  $\alpha 1$ -sintrofina, lo que sugiere que el canal de sodio cardíaco interacciona con la  $\alpha 1$ -sintrofina a través de un dominio complementario.

Hasta el momento, no se había considerado que la región N-terminal de los canales Nav1.5 interviniera en su interacción con otras proteínas (Shy y cols., 2013). Clatot y colaboradores demostraron que el péptido que forma el dominio N-terminal de los canales Nav1.5 (de 132 aminoácidos) es capaz *per se* de aumentar la densidad de la  $I_{Na}$ . Estos autores postulaban que dicho péptido podría ejercer acciones similares a las de las "chaperonas" promoviendo que los canales Nav1.5 superen el sistema de control de calidad y alcancen la membrana plasmática (Clatot y cols., 2012). Nuestros resultados, han demostrado tanto en sistemas de expresión heterólogos como en miocitos ventriculares de rata, que el dominio N-terminal del canal Nav1.5 aumenta la densidad no sólo de la  $I_{Na}$ , sino también de la  $I_{K1}$ . Es muy importante destacar que el aumento de densidad era idéntico al producido por el canal Nav1.5 completo, lo que sugería que el efecto chaperona producido por el dominio N-terminal era responsable del la modulación positiva producida por los canales Nav1.5. Más aún, el aumento de la  $I_{K1}$  producido por el dominio N-terminal sólo aparece en el caso de que no haya subunidades Kir2.3 en los canales que generan la  $I_{K1}$ . Este resultado sugería

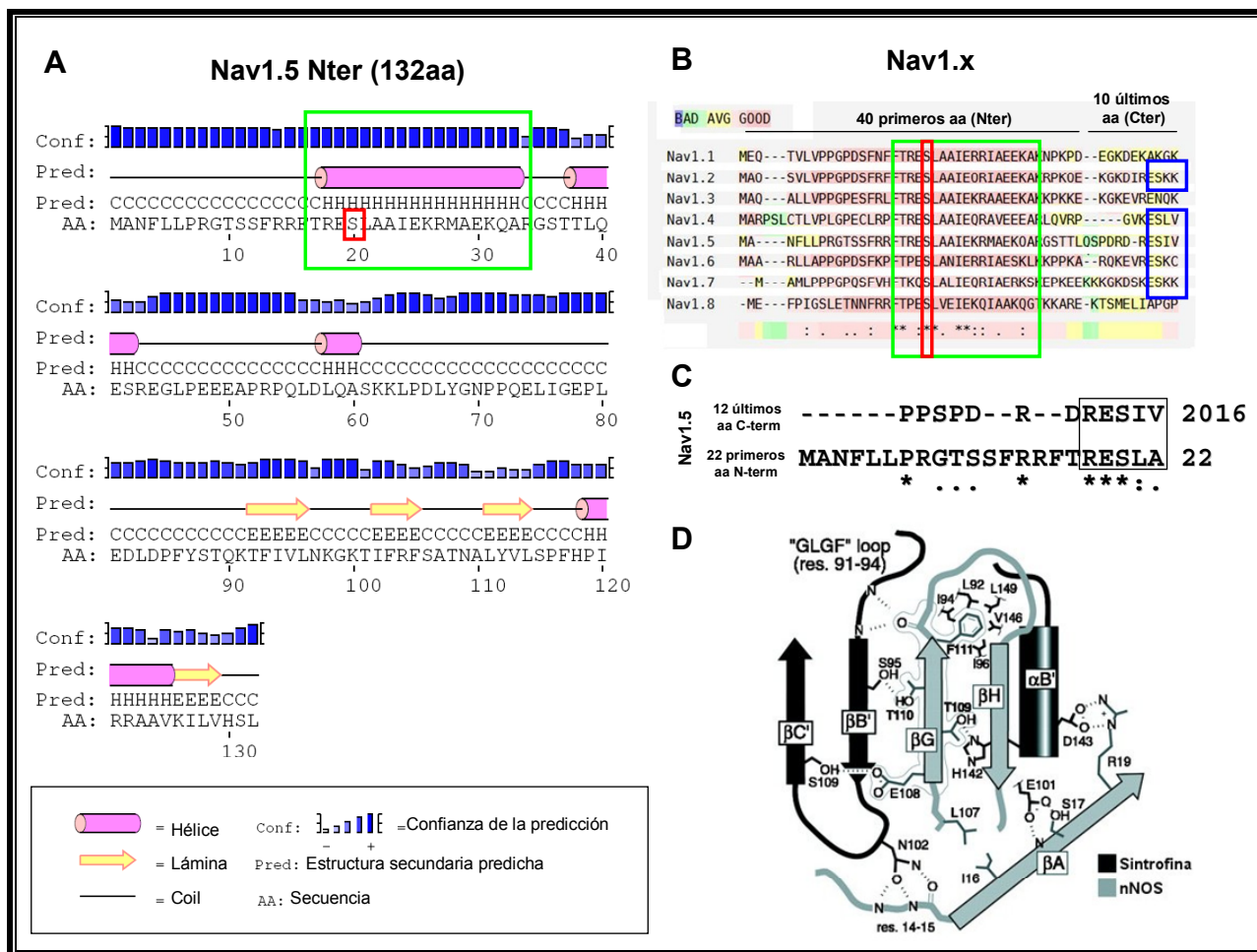


**Figura VI.4. Resumen de los experimentos de modulación recíproca entre Nav1.5, Kir2.1/2.2 y el Nter.** Izquierda, efectos sobre la  $I_{Nav1.5}$ . Derecha, efectos sobre la  $I_{Kir2.1-2.2}$ . ↑, aumento de la densidad de corriente respecto a la transfección del canal solo. =, no se produce ni aumento ni disminución de la densidad de corriente respecto a la transfección del canal solo. Nter, péptido con los 132 primeros aminoácidos de Nav1.5.

que sólo eran modulados de forma positiva aquellos canales (Kir2.1, Kir2.2, Nav1.5) que podían unirse a la  $\alpha$ 1-sintrofina. De hecho, los canales Nav1.5 $\Delta$ PDZ, que sí modulan positivamente a los canales Kir2.1 y Kir2.2, no eran modulados positivamente ni por Kir2.1 ni el péptido N-terminal (Figura VI.4).

## 6. DETERMINANTES MOLECULARES DEL “EFECTO CHAPERONA” DEL Nter

La selectividad e intensidad del efecto chaperona producido por el N-terminal hacía sospechar que era idéntico al producido por el canal Nav1.5 completo. Por tanto, cabía sospechar que también fuera mediado por la unión del N-terminal a la  $\alpha$ 1-sintrofina. El análisis de la secuencia del péptido



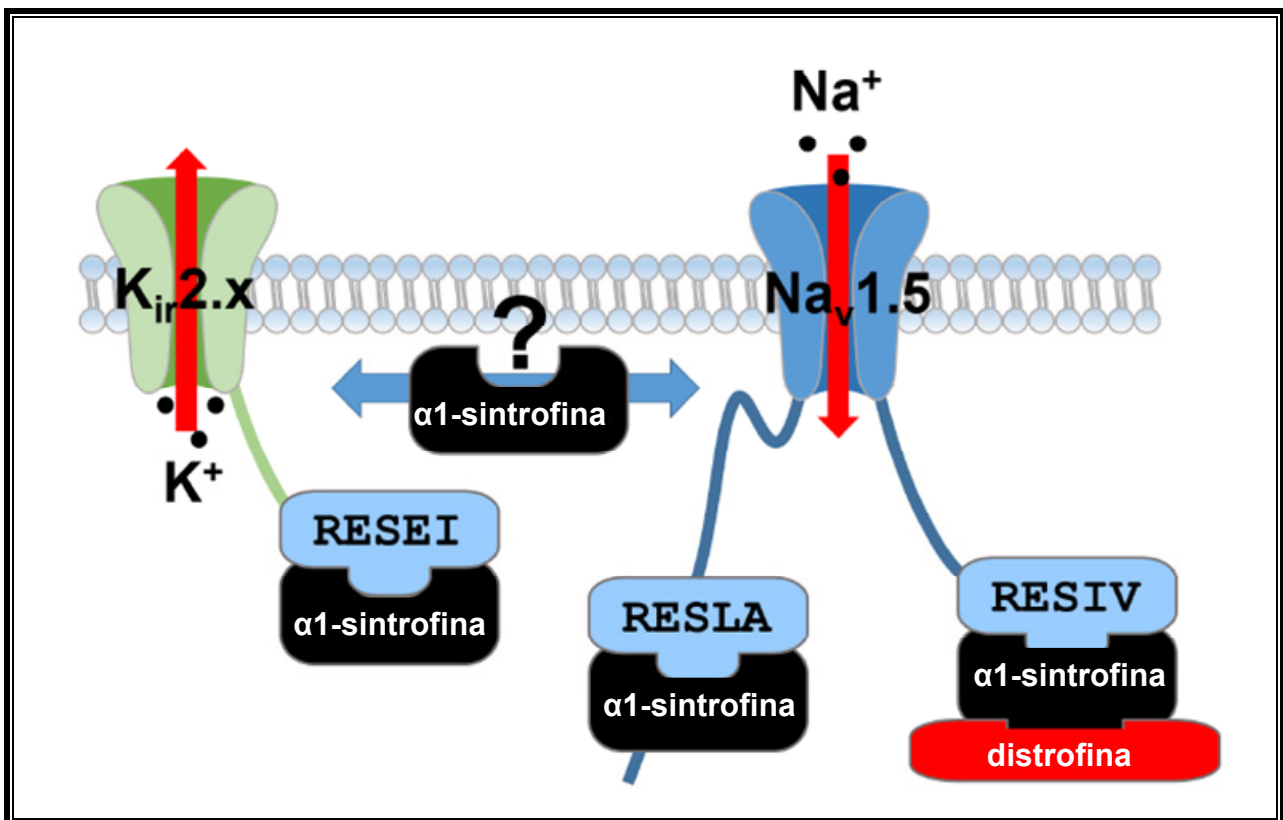
**Figura VI.5. El extremo Nter de Nav1.5 parece contener una secuencia interna de unión a dominios PDZ dónde la serina en posición 20 juega un papel fundamental en la unión a  $\alpha$ 1-sintrofina. (A)** Predicción de la estructura secundaria del extremo N-terminal de Nav1.5 realizada con la aplicación *psipred*. En rojo serina 20, en verde predicción de estructura en  $\alpha$ -hélice dentro de la que se encuentra la Ser20. **(B)** Alineamiento de diferentes canales Nav1.x humanos. Todos tienen la Ser20 (rojo) y la secuencia predicha para  $\alpha$ -hélice (verde) que rodea este aminoácido está altamente conservada. Todos los canales Nav1.x exceptuando las isoformas Nav1.1, 1.3 y 1.8 poseen dominios de unión a PDZ en el C-terminal (azul). **(C)** Alineamiento de los extremos N- y C-terminal de Nav1.5. **(D)** Descripción esquemática de las interacciones entre los dominios PDZ de la sintrofina y la nNOS. *[(D) Adaptada de Hillier y cols., 1999]*

identificó una secuencia de aminoácido (18-RESLA-22) que mantenía un enorme grado de homología con la secuencia lineal de unión a dominios PDZ del extremo C-terminal de Nav1.5 (Figura VI.5C). La combinación de experimentos de mutagénesis dirigida con los de electrofisiología identificó que la Ser en posición 20 es crítica para el “efecto chaperona” (Figura VI.4 y VI.5A). Esta serina es “equivalente” a la serina en posición 2 (p.2) en los dominios C-terminales de unión a PDZ tipo I (Ivarsson, 2012) (Figura VI.5C). Lo que sugería que formaba parte de un dominio de unión a PDZ no C-terminal y, por lo tanto, no canónico.

Para demostrar la existencia de ese dominio de unión a PDZ "interno" en la región N-terminal del canal construimos el mutante Nav1.5 p.S20A. Los resultados demostraron que dicho mutante es

incapaz de modular positivamente la densidad de la  $I_{Kir2.1}$  a pesar de que puede unirse a través de su dominio lineal C-terminal a la  $\alpha 1$ -sintrofina. De hecho, Nav1.5 p.S20A co-inmunoprecipitaba con la  $\alpha 1$ -sintrofina. A continuación, introdujimos la mutación p.S20A en canales Nav1.5 $\Delta$ PDZ. Los resultados demostraron que este mutante es incapaz de co-inmunoprecipitar con la  $\alpha 1$ -sintrofina. La presencia de este dominio no canónico de unión a dominios PDZ explicaría porqué los canales Nav1.5 $\Delta$ PDZ seguían co-inmunoprecipitando con la  $\alpha 1$ -sintrofina en ausencia de la secuencia C-terminal.

Con todos estos datos el modelo que proponemos, y que ha sido recogido en el editorial que comentaba nuestro trabajo (Abriel y Mohler, 2016) (Figura VI.4 y V.6), considera que los canales que pueden unirse a través de su extremo C-terminal a la  $\alpha 1$ -sintrofina (Nav1.5, Kir2.1, y Kir2.2 que hayamos demostrado) son modulados positivamente por la unión del dominio N-terminal del canal Nav1.5 (Ser20) a la  $\alpha 1$ -sintrofina. Esto implica que todos los canales de la familia Nav1.x que



**Figura V.6. Papel clave de la  $\alpha 1$ -sintrofina en la mediación de la interacción y modulación recíproca Kir2.1-2.2 (pero no Kir2.3) y Nav1.5.** La  $\alpha 1$ -sintrofina, a través de su dominio PDZ, se une a los canales Kir2.x y Nav1.5 a través de las secuencias C-terminales canónicas, RESEI y RESIV, respectivamente. Los resultados revelan una secuencia no canónica de unión a dominios PDZ (RESLA) en el dominio N-terminal de Nav1.5. Los detalles moleculares acerca de cómo la unión de la  $\alpha 1$ -sintrofina a los diferentes dominios de dichos canales puede permitir su interacción y regulación, así como la estequiometría de tal macrocomplejo molecular son todavía desconocidos. [Adaptada de Moler y Abriel, 2016]

presentan en la posición equivalente la Ser20 serían capaces de modular positivamente los canales Kir2.1-2.2, pero los canales Kir2.1-2.2 no serían capaces de modular Nav1.1, Nav1.3 y Nav1.8, pues no poseen el dominio de unión a PDZ canónico en el extremo C-terminal (Figura VI.5B).

### 6.1. Características de la secuencia de unión a PDZ presente en el dominio N-terminal de Nav1.5

Datos obtenidos con diversas proteínas que presentan afinidad por los dominios PDZ, incluyendo canales iónicos como hKv1.5 (Eldstrom y cols., 2003; Mathur y cols., 2006), demuestran que la fosforilación de residuos Ser (así como los Thr y Tyr) impide que se produzca la interacción con el dominio PDZ (Ivarsson, 2012). Los programas informáticos que permiten la predicción de los residuos susceptibles de ser fosforilados sugieren que la Ser20 no es un residuo fosforilable por la PKA, pero sí por la PKC, aunque en comparación con otros residuos del canal Nav1.5 la probabilidad de que resultara fosforilada era muy baja. Por otro lado, en un estudio *in vitro* utilizando espectrometría de masas, la Ser20 resultaba ser un sitio de posible fosforilación por la CaMKII, pero este hecho no ha sido confirmado funcionalmente (Herren y cols., 2015). Por tanto, parece poco probable que la fosforilación del residuo Ser20 impida la unión del canal a la  $\alpha$ 1-sintrofina. Cabe destacar por último, que la proteína Nav1.5 no presenta ningún sitio de escisión por proteasas que permitiera que quedara libre la secuencia del dominio de unión a PDZ que convirtiera este "dominio interno" en un dominio C-terminal de unión a PDZ.

Como se ha mencionado una peculiaridad de la secuencia presente en el dominio N-terminal de Nav1.5 capaz de unirse a la  $\alpha$ 1-sintrofina es que carece de grupo carboxilo libre (Figura VI.5C). Como se ha mencionado en el apartado de "Introducción" el grupo carboxilo libre estabiliza la unión de la secuencia lineal en el dominio PDZ. Algunas proteínas PDZ pueden también unirse a dominios de unión a PDZ "internos" si éstos forman parte de una estructura primaria o secundaria que sea estéricamente compatible con la hendidura del dominio PDZ (Shieh y Zhu, 1996; Xia y cols., 1997; Hillier y cols., 1999; Paasche y cols., 2005) (Figura VI.5). Utilizando un programa para la predicción de la estructura secundaria de las secuencias proteicas (*psipred*; Jones, 1999) se observó que la secuencia de unión a PDZ del Nter puede encontrarse en medio de una estructura en  $\alpha$ -hélice (Figura VI.5A), aunque no se ha podido cristalizar el extremo Nter de Nav1.5 para poder confirmar esta hipótesis. Es importante destacar que entre los pocos ejemplos de proteínas PDZ capaces de unir dominios lineales sin restos carboxilo terminales se encuentra la  $\alpha$ 1-sintrofina. Así, en músculo esquelético la nNOS se une al dominio PDZ de la sintrofina a través de un dominio de unión a PDZ localizado en el dominio N-terminal que consta de una horquilla  $\beta$  (residuos 100-130)

(Hillier y cols., 1999) (Figura VI.5D). En este caso, el grupo carboxilo terminal es reemplazado por un giro  $\beta$  al final de la horquilla  $\beta$  de la nNOS (Hillier y cols., 1999). Los receptores de Endotelina Tipo A también presentan un dominio interno de unión a PDZ, cuya estructura secundaria es parecida a la del giro  $\beta$  de la nNOS y que parece actuar como una señal de reciclaje endocítico (Paasche y cols., 2005). Asimismo, ha sido también propuesto que los canales neuronales Nav1.8 se unen a Pdzd2, una proteína con múltiples dominios PDZ, por medio del lazo intracelular entre los dominios II y III del canal (Shao y cols., 2009).

## 6.2. Localización del canalosoma Nav1.5-Kir2.1/2.2

Como se ha mencionado, los canales Nav1.5 forman agregados que están confinados en nanodominios funcionales (Bhargava y cols., 2013) ya sea en los discos intercalares (Sato y cols., 2009; Petitprez y cols., 2011; Makara y cols., 2014; Agullo-Pascual y cols., 2014) o en membrana lateral (Gavillet y cols., 2006; Shy y cols., 2014). Esta última comprende las invaginaciones de membrana denominadas “Túbulos T” y las crestas. De hecho, el conjunto de canales Nav1.5 localizados en las crestas interacciona con el el complejo de proteínas asociadas a la distrofina a través de la interacción directa con la  $\alpha 1$ -sintrofina y está involucrado en la propagación longitudinal y transversal del impulso cardíaco (Gavillet y cols., 2006; Shy y cols., 2014). Se ha demostrado que el extremo C-terminal de unión a dominios PDZ de Nav1.5 es fundamental para la expresión de Nav1.5 en las crestas pero no en los discos intercalares (Shy y cols., 2014). Asimismo, los registros de la  $I_{Nav1.5}$  en "macroparches" mostraban una disminución de un 60% en la  $I_{Na}$  registrada en la membrana lateral de miocitos de ratón que expresaban los canales Nav1.5 $\Delta$ PDZ (Shy y cols., 2014). Podría especularse que el 40% restante de la  $I_{Na}$  es generada por los canales Nav1.5 que interaccionan con la  $\alpha 1$ -sintrofina a través del dominio de unión a PDZ del N-terminal. Además, los miocitos de ratón que expresaban Nav1.5 $\Delta$ PDZ presentaban una densidad de la  $I_{K1}$  similar a la generada en miocitos procedentes de ratón WT (Shy y cols., 2014). Estos resultados concuerdan con los presentados en esta Tesis Doctoral (Figura V.45) en el sentido de que los canales Nav1.5 $\Delta$ PDZ pueden incrementar la densidad de la  $I_{Kir2.1}$  de la misma forma que los canales Nav1.5 WT, puesto que estos mutantes tienen el extremo N-terminal intacto. Nuestra hipótesis, en consecuencia, es que los canales Nav1.5 cuya expresión es modulada positivamente por los canales Kir2.1-2.2 son aquellos que están unidos a  $\alpha 1$ -sintrofina en la membrana lateral de los miocitos muy probablemente agrupados en las crestas. Es probable, por tanto, que los canales Nav1.5 y los Kir2.1/2.2 estén formando canalosomas conjuntos en las crestas de la membrana de los miocitos cardíacos donde coordinen la excitabilidad y refractariedad cardíacas.

**RESUMEN**

Las interacciones  $I_{Na}$  -  $I_{K1}$  son importantes en la estabilización y control de la frecuencia de los rotors que son responsables de las arritmias fibrilatorias (Noujaim y cols., 2007b). Por lo tanto, la interacción intermolecular recíproca de los canales Kir2.1/2.2 y Nav1.5 tiene profundas consecuencias en el control de la excitabilidad cardíaca en condiciones fisiológicas y en la estabilización de los frentes de reentrada espirales que generan las arritmias fibrilatorias.

En esta Tesis Doctoral proporcionamos nuevos conocimientos acerca de las interacciones moleculares de los canales que generan la  $I_{Na}$  y la  $I_{K1}$ . Asimismo, proponemos que la interacción Kir2.x/Nav1.5 está limitada a los miocitos ventriculares. Por último, hemos demostrado el papel crítico que juega la Ser20 del dominio N-terminal de los canales Nav1.5 y la  $\alpha$ 1-sintrofina en la modulación recíproca de los canales Nav1.5 y Kir2.1/2.2 (Figura V.6). Los detalles moleculares acerca de cómo la unión de la  $\alpha$ 1-sintrofina a los diferentes dominios de dichos canales puede permitir su interacción y regulación, así como la estequiometría de tal macrocomplejo molecular son todavía desconocidos y deberán esclarecerse en el futuro.



## **VII. Conclusiones/Conclusions**



## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la presente **TESIS DOCTORAL** en sistemas de expresión heterólogos, miocitos ventriculares de rata y miocitos auriculares humanos nos han permitido obtener las siguientes **CONCLUSIONES**:

- 1) En la membrana de los miocitos cardiacos, los canales Nav1.5 y Kir2.1 se encuentran a una distancia menor de 40 nm, lo que sugiere que interaccionan entre sí formando parte de un mismo canalosoma.
- 2) La expresión de los canales Nav1.5 aumenta la densidad de la corriente generada por homo- y heterotetrámeros de canales Kir2.1 y Kir2.2, pero no la generada por homo- o heterotetrámeros de canales Kir2.3.
- 3) En los miocitos auriculares humanos, el aumento de la  $I_{K1}$  producido por la fibrilación auricular no se acompaña de un aumento de la  $I_{Na}$ . Este resultado se explica por la presencia de canales Kir2.3 en el tejido auricular humano. Por tanto, proponemos que la modulación recíproca positiva entre la  $I_{Na}$  y la  $I_{K1}$  se producirá exclusivamente en el tejido ventricular.
- 4) La modulación recíproca positiva depende de forma crítica de la unión de los canales Kir2.x y Nav1.5 a través de sus dominios lineales de unión a PDZ, a la proteína de anclaje  $\alpha 1$ -sintrofina. SAP97, si bien controla la expresión y/o función de los canales Kir2.x y Nav1.5, no participa en su modulación recíproca positiva.
- 5) Los canales Nav1.5 pueden interaccionar con la  $\alpha 1$ -sintrofina a través de dos secuencias de unión a dominios PDZ: una canónica, localizada en el extremo C-terminal y otra “interna”, que carece de residuo carboxilo libre, localizada en el dominio N-terminal y en la que la serina en posición 20 es crítica.
- 6) El dominio N-terminal del canal Nav1.5 *per se* ejerce efecto “chaperona” uniéndose a través de su secuencia de unión a PDZ "interna" a la  $\alpha 1$ -sintrofina. Los canales que pueden unirse a la  $\alpha 1$ -sintrofina (Kir2.1, Kir2.2 y Nav1.5 pero no Kir2.3) son capaces de ser modulados positivamente por el dominio N-terminal de los canales Nav1.5.



## CONCLUSIONS

The results of this **DOCTORAL THESIS** obtained in heterologous expression systems, rat ventricular myocytes, and human atrial myocytes led us to get the following **CONCLUSIONS**:

- 1) Nav1.5 and Kir2.1 channels are located at less than 40 nm apart from each other at the membrane of cardiac myocytes, suggesting that they interact between them and form part of the same channelosome.
- 2) Expression of Nav1.5 channels increases the density of the current generated by Kir2.1 and Kir2.2 homo- and heterotetramers, but not that generated by Kir2.3 homo- and heterotetramers.
- 3) In human atrial myocytes, the atrial fibrillation-induced increase of the  $I_{K1}$  is not accompanied by an increase in the  $I_{Na}$ . This result can be explained by the presence of Kir2.3 channels in the human atrial tissue. Therefore, we propose that the positive reciprocal modulation between the  $I_{Na}$  and the  $I_{K1}$  will be produced, exclusively, in the ventricular tissue.
- 4) The positive reciprocal modulation critically depends on the binding of both Kir2.x and Nav1.5 channels through their lineal PDZ-binding domains, to  $\alpha$ 1-syntrophin. SAP97, which controls the expression and/or function of Kir2.x and Nav1.5 channels, is not involved in their positive reciprocal modulation
- 5) Nav1.5 channels can interact with  $\alpha$ 1-syntrophin through two PDZ-binding domain sequences. The first one is the canonical sequence located at the C-terminus (SIV). The second one, or “internal”, lacks the free carboxylate group and is located at the N-terminal domain and determined by serine at position 20.
- 6) Nav1.5 N-terminal domain *per se* exerts a “chaperone-like” effect by binding to  $\alpha$ 1-syntrophin through its internal PDZ-binding sequence. The channels that complex with  $\alpha$ 1-syntrophin (Kir2.1, Kir2.2 and Nav1.5) are amenable to be positively modulated by the N-terminal domain of Nav1.5 channels.



## **VIII. Abreviaturas**



|  |   |
|--|---|
| $\epsilon_r$ : constante dieléctrica de la membrana  | ARN: Ácido ribonucleico   |
| $\Psi$ : aminoácido hidrofóbico  | ARNm: Ácido ribonucleico mensajero  |
| $\lambda_{em}$ : Longitud de onda de emisión   | AsODN: Oligonucleótidos antisentido<br>( <i>Antisense oligonucleotides</i> )                            |
| $\lambda_{ex}$ : Longitud de onda de excitación  | ATP: Adenosín trifosfato  |
| 4-AP: 4-Aminopiridina  | AV: Aurículo-ventricular  |
| A: Superficie de membrana  | BCA: Ácido bicinconínico  |
| aa: Aminoácido   | BDM: 2,3-Butanodiona monoxima   |
| A (Ala): Alanina   | BFA: Brefeldina A   |
| C (Cys): Cisteína  | BSA: Albúmina de suero bovino<br>( <i>Bovine serum albumin</i> )  |
| D (Asp): Ácido aspártico   | [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>ex/i</sub> : Concentración extra/intracelular de Ca <sup>2+</sup>              |
| E (Glu): Ácido glutámico   | CaM: Calmodulina  |
| F (Phe): Fenilalanina  | CaMKII: Calcio calmodulina quinasa II   |
| G (Gly): Glicina   | Cav3: Caveolina-3   |
| H (His): Histidina   | CHO: Células de ovario de hámster chino<br>( <i>Chinese Hamster Ovary cells</i> )                       |
| I (Ile): Isoleucina  | C <sub>m</sub> : Capacitancia de la membrana celular  |
| K (Lys): Lisina  | CNIC: Centro Nacional de Investigaciones<br>Cardiovasculares Carlos III                                 |
| L (Leu): Leucina   | Co-IP: Coimmunoprecipitación  |
| M (Met): Metionina   | cp173Venus: Permutación circular en el aa 173 de Venus<br>( <i>Venus circular permutation 173</i> )     |
| N (Asn): Asparagina  | COS: ( <i>CV-1 in Origin with SV40 genes</i> ). Referido a<br>células derivadas de fibroblastos de mono |
| P (Pro): Prolina   | C-terminal: Extremo carboxilo terminal de una<br>proteína   |
| Q (Gln): Glutamina   | Cx43: Conexina 43   |
| R (Arg): Arginina  | DAPC: Complejo asociado a distrofina<br>( <i>Dystrophin-associated protein complex</i> )                |
| S (Ser): Serina  | DCI: Desfibrilador cardioversor implantable   |
| T (Thr): Treonina  | DGP: Dominio citoplasmático   |
| V (Val): Valina  | DE: Desviación estándar   |
| W (Trp): Triptófano  | DHP: 1,4-Dihidropiridinas   |
| Y (Tyr): Tirosina  | DI: Discos intercalares   |
| Acc. no.: <i>Accession number</i> . Referido al código<br>asignado a una secuencia de ADN o proteína | DIA: Dominio de interacción $\alpha$ del canal de Ca <sup>2+</sup>                                      |
| ACh: Acetilcolina  | DIB: Dominio de interacción $\beta$ del canal de Ca <sup>2+</sup>                                       |
| Ad: Adenovirus   | DMEM: <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>   |
| AD: Aurícula derecha   | DN: Dominancia negativa   |
| ADN: Ácido desoxirribonucleico   | <i>dsRNA</i> : ARN de doble cadena  |
| ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario   |   |
| ADP: Adenosín difosfato  |   |
| AKAP: Proteína de anclaje para la PKA  |   |
| AI: Aurícula izquierda   |   |
| ANOVA: Análisis de la varianza<br>( <i>ANalysis Of VAriance</i> )                                    |   |
| ARAI: Antagonista del receptor de angiotensina II  |   |

## Abreviaturas

- (*double stranded RNA*)
- DPA: Duración del potencial de acción
- DPCI: Defecto progresivo de la conducción intracardíaca
- DPP: Proteínas dipeptidilpeptidasas
- DPSSL: Láser de estado sólido bombeado por diodos (*Diode-Pumped Solid-State Laser*)
- DVL2: (*Dishevelled Segment Polarity Protein 2*)
- DTBP: 3,3-ditiobispropionimidato
- DTM: Dominio transmembrana
- DTX: Dendrotoxina
- E*: Potencial
- ECL: Quimioluminiscencia potenciada (*Enhanced ChemiLuminescence*)
- ECG: Electrocardiograma
- EGTA: Ácido etilenglicol-bis-(2-aminoetiléter)-Tetraacético
- $E_K$ : Potencial de Nernst para el  $K^+$
- $E_{Na}$ : Potencial de Nernst para el  $Na^+$
- $E_m$ : Potencial de membrana
- EEM: Error estándar de la media
- Endo: Endocardio
- Epi: Epicardio
- ET<sub>A</sub>: Receptor de endotelina-1
- FA: Fibrilación auricular
- FAC: Fibrilación auricular crónica
- F: femenino (sexo del paciente)
- F*: Constante de Faraday ( $9.65 \cdot 10^4$  C/mol)
- FITC: (*fluorescein-isothiocyanate*)  
Referido al filtro utilizado para ver fluoresceína
- FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos (*Fibroblast Growth Factor*)
- FP: Fibras de Purkinje
- fs: *Frame-shift*. (Desplazamiento del marco de lectura)
- FV: Fibrilación ventricular
- G: Conductancia
- $\Delta G$ : Energía de Gibbs
- GFP: Proteína fluorescente verde (*Green fluorescent protein*)
- GPD1-L: *Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase 1-Like*
- GST: *Glutathione S-Transferase*
- GTP: Guanosín trifosfato
- GUK: Referido a dominio guanilato quinasa en SAP97
- $[H^+]_i$ : Concentración intracelular de protones
- HCN: Canales activados por la hiperpolarización regulados por nucleótidos cíclicos (*Hyperpolarization activated Cyclic Nucleotide-gated channels*)
- HEK293: Células embrionarias humanas de riñón (*Human Embryonic Kidney cells*)
- HEPES: Ácido N-Hidroxietilpiperacina-N'-etanesulfónico
- hERG: *Human Ether-à-go-go Related Gene*
- HMW: *High molecular weight*
- hKir2.x: Kir2.x humano
- hNav1.5: Nav1.5 humano
- hNav $\beta$ 1: Subunidad  $\beta$ 1 del canal de sodio cardíaco humano
- HRP: Peroxidasa de rábano (*horseradish peroxidase*)
- HTA: Hipertensión arterial
- HVA: *High-Voltage Activated*
- I*: Intensidad de corriente macroscópica
- i*: Intensidad de corriente unitaria
- $I_{Ca}$ : Corriente de entrada de  $Ca^{2+}$   
 $I_{Ca,L} / I_{Ca,T}$ :  $I_{Ca}$  generada por canales tipo L/tipo T
- ID: (*interdomain linker loop*)
- IECA: Inhibidor de la enzima convertidora de Angiotensina
- $I_f$ : Corriente hiperpolarizante marcapasos (*"funny current"*)
- Ig: Inmunoglobulina
- $I_{K1}$ : Corriente de  $K^+$  con rectificación interna
- $I_{K,ACh}$ : Corriente de salida de  $K^+$  activada por ACh
- $I_{K,ATP}$ : Corriente de  $K^+$  sensible a ATP
- $I_{Kir2,x}$ : Corriente de  $K^+$  generada por canales Kir2.x
- $I_{Kr}$ : Corriente rectificadora tardía de  $K^+$  de activación rápida
- $I_{Ks}$ : Corriente rectificadora tardía de  $K^+$  de activación lenta
- $I_{Kur}$ : Corriente rectificadora tardía de  $K^+$  de activación
- $I_{Na}$ : Corriente de entrada de  $Na^+$

- $I_{Na,L}$ : Corriente tardía de entrada de  $Na^+$
- INAD (*Inactivation no afterpotential D protein*)
- $[ion]_{e/i}$ : Concentración extra/intracelular del ion
- IP: Inyección intraperitoneal
- iRNA*: ARN de interferencia  
(*interference RNA*)
- $I_{to1}$ : Corriente transitoria de salida de  $K^+$  cardíaca
- $I_{to2}$ : Corriente transitoria de salida de  $Cl^-$  activada por  $Ca^{2+}$
- I-V: Relación intensidad de corriente-voltaje
- $k$ : Valor de la pendiente de la curva
- $[K^+]_{e/i}$ : Concentración extra/intracelular de  $K^+$
- $K_{ACh}$ : Canales de  $K^+$  activados por ACh
- $K_{Ca}$ : Canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$
- KChAP: *K<sup>+</sup> Channel-Associated Protein*
- KChIP: *K<sub>v</sub> Channel Interacting Protein*
- Kir: Canales de  $K^+$  rectificadores internos
- Kv: Canales de  $K^+$  dependientes de voltaje
- LJP: *Liquid Junction Potencial*
- LMW: *Low molecular weight*
- LVA: *Low-Voltage Activated*
- M: masculino (sexo del paciente)
- MAGUK: (*membrane-associated guanilate kinase*)
- mdx*: Referido a ratones deficientes en distrofina
- miRNA: micro ARN
- minK: *Minimal K<sup>+</sup> channel subunit*
- MiRP: *MinK-Related Peptides*
- MOG1: (*Multicopy suppressor of gsp-1*)
- MOI: Multiplicidad de infección  
(*Multiplicity of infection*)
- MOPS: Ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfónico
- mTq2: *monomeric Turquoise 2*. Referido a variante de la CFP
- $[Na^+]_{e/i}$ : Concentración extra/intracelular de  $Na^+$
- Nav1.5- $\beta$ : Cotransfección 1:1 de las subunidades alfa y beta 1 del canal de sodio cardíaco humano
- Nav1.5 $\Delta$ PDZ: Canal Nav1.5 sin el dominio de unión a PDZ en el extremo c-terminal
- NBD: Dominios de unión de nucleótidos
- NDS: Detergente neutro soluble  
(*Neutral Detergent Soluble*)
- NHERF: (*Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger Regulatory Factors*)
- NIH: *Nacional Institutes of Health*
- nNOS: (*Neuronal nitric oxide synthase*). Óxido nítrico sintasa neuronal
- N-terminal: Extremo amino terminal de una proteína
- Nter: Extremo amino terminal del canal de sodio cardíaco humano (132aa)
- NYHA: New York Heart Association
- ODC: Ornitina descarboxilasa
- PA: Potencial de acción
- PALS1: (*protein-associated with Lin7, Stardust, MPP5*)
- Par6: (*Partitioning defective protein 6*)
- PBS: Tampón Fosfato Salino (*Phosphate Buffered Saline*)
- PBS-T: PBS con Tween20
- PCCD: Enfermedad progresiva del sistema de conducción Cardíaco
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa  
(*Polymerase Chain Reaction*)
- PDZ: Referido a dominio PDZ  
(*Post synaptic density protein (PSD95), Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1), and Zonula occludens-1 protein (zo-1)*)
- PFA: Paraformaldehído
- PH: Dominio homólogo a plecstrina
- $P_{ion}$ : Permeabilidad de la membrana a un determinado ion
- PIP<sub>2</sub>: Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato
- PKA: Proteína quinasa A
- PKC: Proteína quinasa C
- PKP2: (*Plakophilin-2*)
- PLA: Ensayo de ligación por proximidad  
(*Proximity Ligation Assay*)
- PMA: Miristato-acetato de forbol  
(*Phorbol Myristate Acetate*)
- Poli-lys: Poli Lisina
- PR: Potencial de reposo
- PSD: proteína de densidad pos-sináptica
- $Q$ : Carga
- Qss: *Quasi-Steady-State* del canal  $K_{ACh}$

## Abreviaturas

- R: Constante universal de los gases (8.31 J/mol·K)
- RA-  $\beta_1$ : Receptor adrenérgico  $\beta_1$
- RE: Retículo endoplásmico
- RIPA buffer: (*RadioImmunoPrecipitation Assay buffer*)  
Referido al buffer utilizado en la extracción de proteínas tanto de cultivo celular como de tejido cardíaco
- rpm: Revoluciones por minuto
- RS: Ritmo sinusal
- RyR1/RyR2: Receptores de rianodina tipos 1 y 2
- SA: Senoauricular
- SAMDC: S-adenosilmetionina descarboxilasa
- SAT: Síndrome de Andersen-Tawil
- SBr: Síndrome de Brugada
- SDS-PAGE: (*Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*)
- SH3: Referido a dominio SH3 de SAP97  
(*Src homology 3*)
- shRNA*: *short hairpin RNA*. Referido a un tipo de ARN de interferencia utilizado para silenciar una determinada proteína
- siRNA*: *small interference RNA*. Referido a un tipo de ARN de interferencia utilizado para silenciar una determinada proteína
- SJLN: Síndrome de Jervell y Lange-Nielsen
- SLMAP: (*Sarcolemmal membrana-associated protein*)
- SNC: Sistema nervioso central
- SNP: Sistema nervioso periférico
- SQTC: Síndrome de QT corto
- SQTL: Síndrome de QT largo
- SrcH-3: Referido a dominio de SAP97  
(*Src homology-3*)
- SSE: Síndrome del seno enfermo
- STAT: *Signal Transducers and Activators of Transcription*
- SU: Dominio único de sintrofinas
- T: Temperatura absoluta
- TdP: *Torsade de Pointes*
- TEA: Tetraetilamonio
- TGX: (*Tris-Glycine eXtended*). Referido a geles de electroforesis de proteínas *stain free*
- TM: Transmembrana (segmento)
- TRITC: (*tetramethylrhodamine isothiocyanate*)  
Referido al filtro utilizado para ver rodamina
- TTX: Tetrodotoxina
- TVPC: Taquicardia ventricular polimórfica inducida por Catecolaminas
- VC: velocidad de conducción
- Vh: Punto medio de la curva
- VP: Vena pulmonar
- WT: *Wild type*
- WW: Referido a dominio rico en triptófanos
- z: Número de oxidación

## **IX. Bibliografía**



“La mente necesita libros como la espada necesita una piedra de afilar si quiere mantener su agudeza. Por eso leo tanto, Jon Nieve”

Tyrion Lannister

“Canción de Hielo y Fuego”

- Abbott GW, Sesti F, Splawski I, Buck ME, Lehmann MH, Timothy KW, Keating MT, Goldstein SAN. MiRP1 forms  $I_{Kr}$  potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell* 1999;**97**:175-187.
- Abriel H, Kass RS. Regulation of the voltage-gated cardiac sodium channel Nav1.5 by interacting proteins. *Trends Cardiovasc Med*. 2005;**15**:35-40.
- Abriel H, Sottas V. Unexpected  $\alpha$ - $\alpha$  interactions with Nav1.5 genetic variants in Brugada syndrome. *Circ Cardiovasc Genet*. 2014;**7**:97-9.
- Abriel H, Rougier JS, Jalife J. Ion channel macromolecular complexes in cardiomyocytes: roles in sudden cardiac death. *Circ Res*. 2015;**116**:1971-88.
- Ackerman MJ, Clapham DE. Ion channels - Basic science and clinical disease. *N Eng J Med* 1997;**336**:1575-1586.
- Ackerman MJ. Cardiac channelopathies: It's in the genes. *Nat Med* 2004;**10**:463-464.
- Akai J, Makita N, Sakurada H, Shirai N, Ueda K, Kitabatake A, Nakazawa K, Kimura A, Hiraoka M. A novel SCN5A mutation associated with idiopathic ventricular fibrillation without typical ECG findings of Brugada syndrome. *FEBS Lett* 2000;**479**:29-34.
- Albrecht DE, Froehner SC. Syntrophins and dystrobrevins: defining the dystrophin scaffold at synapses. *Neurosignals*. 2002;**11**:123-9.
- Albsoul-Younes AM, Sternweis PM, Zhao P, Nakata H, Nakajima S, Nakajima Y, Kozasa T. Interaction sites of the G protein  $\beta$  subunit with brain G protein-coupled inward rectifier  $K^+$  channel. *J Biol Chem* 2001;**276**:12712-12717.
- Aldrich RW, Corey DP, Stevens CF. A reinterpretation of mammalian sodium channel gating based on single channel recording. *Nature* 1983;**306**:436-441.
- Aleksandrov A, Velimirovic B, Clapham DE. Inward rectification of the IRK1  $K^+$  channel reconstituted in lipid bilayers. *Biophys J* 1996;**70**:2680-2687.
- Allessie MA, Lammers WJEP, Bonke FIM, Hollen J. Experimental evaluation of Moe's multiple wavelet hypothesis of atrial fibrillation. En: *Cardiac electrophysiology and arrhythmias*. Zipes DP, Jalife J (Eds.) 1985; 265-276.
- Allouis M, Le Bouffant F, Wilders R, Pérez D, Schott JJ, Noireaud J, Le Marec H, Mérot J, Escande D, Baró I. 14-3-3 is a regulator of the cardiac voltage-gated sodium channel Nav1.5. *Circ Res*. 2006;**98**:1538-46.
- Almers W. Potassium conductance changes in skeletal muscle and the potassium concentration in the transverse tubules. *J Physiol* 1972;**225**:33-56.
- Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*. 2004;**431**:350-5.
- Amin AS, Meregalli PG, Bardai A, Wilde AA, Tan HL. Fever increases the risk for cardiac arrest in the Brugada syndrome. *Ann Intern Med*. 2008;**149**:216-8.
- Amin AS, Tan HL, Wilde AA. Cardiac ion channels in health and disease. *Heart Rhythm*. 2010;**7**:117-26.
- Amin AS, Pinto YM, Wilde AA. Long QT syndrome: beyond the causal mutation. *J Physiol*. 2013;**591**:4125-39.
- Amorós I, Barana A, Caballero R, Gómez R, Osuna L, Lillo MP, Tamargo J, Delpón E. Endocannabinoids and cannabinoid analogues block human cardiac Kv4.3 channels in a receptor-independent manner. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;**48**:201-10.
- Amorós I, Dolz-Gaitón P, Gómez R, Matamoros M, Barana A, de la Fuente MG, Núñez M, Pérez-Hernández M, Moraleda I, Gálvez E, Iriepa I, Tamargo J, Caballero R, Delpón E. Propafenone blocks human cardiac Kir2.x channels by decreasing the negative electrostatic charge in the cytoplasmic pore. *Biochem Pharmacol*. 2013;**86**:267-78.
- Amos GJ, Wettwer E, Metzger F, Li Q, Himmel HM, Ravens U. Differences between outward currents of human atrial and subepicardial ventricular myocytes. *J Physiol* 1996;**491**:31-50.

## Bibliografía

- An WF, Bowlby MR, Betty M, Cao J, Ling HP, Mendoza G, Hinson JW, Mattsson KI, Strassle BW, Trimmer JS, Rhodes KJ. Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature* 2000;**403**:553-556.
- Andelfinger G, Tapper AR, Welch RC, Vanoye CG, George AL Jr, Benson DW. KCNJ2 mutation results in Andersen syndrome with sex-specific cardiac and skeletal muscle phenotypes. *Am J Hum Genet* 2002;**71**:663-668.
- Andersen JS, Egeblad H, Abildgaard U, Aldershvile J, Godtfredsen J. Atrial fibrillation and left atrial enlargement: cause or effect?. *J Intern Med.* 1991;**229**:253-6.
- Anumonwo JMB, Lopatin AN. Cardiac strong inward rectifier potassium channels. *J Mol Cell Cardiol* 2010;**48**:45-54.
- Antzelevitch C. The Brugada syndrome: ionic basis and arrhythmia mechanisms. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2001;**12**:268-272.
- Antzelevitch C, Brugada P, Brugada J, Brugada R, Towbin JA, Nademanee K. Brugada syndrome: 1992-2002: a historical perspective. *J Am Coll Cardiol.* 2003;**41**:1665-71.
- Antzelevitch C. Cellular basis for the repolarization waves of the ECG. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;**1080**:268-81.
- Antzelevitch C, Burashnikov A, Sicouri S, Belardinelli L. Electrophysiologic basis for the antiarrhythmic actions of ranolazine. *Heart Rhythm.* 2011;**8**:1281-90.
- Antzelevitch C. Genetic, molecular and cellular mechanisms underlying the J wave syndromes. *Circ J.* 2012;**76**:1054-65.
- Apkon M, Nerbonne JM. Characterization of two distinct depolarization-activated K<sup>+</sup> currents in isolated adult rat ventricular myocytes. *J Gen Physiol* 1991;**97**:973-1011.
- Arakel EC, Brandenburg S, Uchida K, Zhang H, Lin YW, Kohl T, Schrul B, Sulkin MS, Efimov IR, Nichols CG, Lehnart SE, Schwappach B. Tuning the electrical properties of the heart by differential trafficking of KATP ion channel complexes. *J Cell Sci.* 2014;**127**:2106-19.
- Armstrong CM. Inactivation of the potassium conductance and related phenomena caused by quaternary ammonium ion rejection in squid axons. *J Gen Physiol* 1969;**54**:553-575.
- Armstrong CM. Ionic pores, gates and gating currents. *Q Rev Biophys* 1974;**7**:179-210.
- Armstrong CM. Sodium channel and gating currents. *Physiol Rev* 1981;**61**:644-682.
- Armstrong CM, Bezanilla F. Currents related to movement of the gating particles of the sodium channels. *Nature* 1973;**242**:459-461.
- Armstrong CM, Bezanilla F. Inactivation of the sodium channel. II. Gating current experiments. *J Gen Physiol.* 1977;**70**:567-90.
- Arnestad M, Crotti L, Rognum TO, Insolia R, Pedrazzini M, Ferrandi C, Vege A, Wang DW, Rhodes TE, George AL Jr, Schwartz PJ. Prevalence of long-QT syndrome gene variants in sudden infant death syndrome. *Circulation.* 2007 **23**;**115**:361-7.
- Asano Y, Davidenko JM, Baxter WT, Gray RA, Jalife J. Optical mapping of drug-induced polymorphic arrhythmias and torsade de pointes in the isolated rabbit heart. *J Am Coll Cardiol.* 1997;**29**:831-42.
- Atienza F, Almendral J, Moreno J, Vaidyanathan R, Talkachou A, Kalifa J, Arenal A, Villacastin JP, Torrecilla EG, Sanchez A, Ploutz-Snyder R, Jalife J, Berenfeld O. Activation of inward rectifier potassium channels accelerates atrial fibrillation in humans: Evidence for a reentrant mechanism. *Circulation.* 2006;**114**:2434-2442.
- Attwell D, Cohen I, Eisner D, Ohba M, Ojeda C. The steady state TTX-sensitive ("window") sodium current in cardiac Purkinje fibres. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 1979;**379**:2:137
- Bähring R, Milligan CJ, Vardanyan V, Engeland B, Young BA, Dannenberg J, Waldschutz R, Edwards JP, Wray D, Pongs O. Coupling of voltage-dependent potassium channel inactivation and oxidoreductase active site of Kvβ subunits. *J Biol Chem* 2001;**276**:22923-22929.
- Baker RP, Harreman MT, Eccleston JF, Corbett AH, Stewart M. Interaction between Ran and Mog1 is required for efficient nuclear protein import. *J Biol Chem.* 2001;**276**:41255-62.
- Balser JR, Nuss HB, Romashko DN, Marbán E, Tomaselli GF. Functional consequences of lidocaine binding to slow-inactivated sodium channels. *J Gen Physiol* 1996;**107**:643-658.
- Balser JR. The cardiac sodium channel: gating function and molecular pharmacology. *J Mol Cell Cardiol* 2001;**33**:599-613.

- Bankston JR, Kass RS. Molecular determinants of local anesthetic action of beta-blocking drugs: Implications for therapeutic management of long QT syndrome variant 3. *J Mol Cell Cardiol.* 2010; **48**:246-53.
- Bao L, Kefaloyianni E, Lader J, Hong M, Morley G, Fishman GI, Sobie EA, Coetzee WA. Unique properties of the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel in the mouse ventricular cardiac conduction system. *Circ Arrhythm Electrophysiol.*; **4**:926-35.
- Barana A, Matamoros M, Dolz-Gaitón P, Pérez-Hernández M, Amorós I, Núñez M, Sacristán S, Pedraz Á, Pinto Á, Fernández-Avilés F, Tamargo J, Delpón E, Caballero R. Chronic atrial fibrillation increases microRNA-21 in human atrial myocytes decreasing L-type calcium current. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2014; **7**:861-8.
- Barhanin J, Lesage F, Guillemare E, Fink M, Lazdunski M, Romey G. KvLQT1 and Isk (minK) proteins associate to form the I<sub>Ks</sub> cardiac potassium current. *Nature* 1996; **384**:78-80.
- Baronas VA, Kurata HT. Inward rectifiers and their regulation by endogenous polyamines. *Front Physiol.* 2014; **27**:5:325.
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004; **116**:281-97.
- Bartolome J, Huguenard J, Slotkin TA. Role of ornithine decarboxylase in cardiac growth and hypertrophy. *Science* 1980; **210**:793-794.
- Baukowitz T, Tucker SJ, Schulte U, Benndorf K, Ruppersberg JP, Fakler B. Inward rectification in KATP channels: a pH switch in the pore. *EMBO J.* 1999; **18**:847-53
- Baumgarten CM, Isenberg G, McDonald TF, Ten Eick RE. Depletion and accumulation of potassium in the extracellular clefts of cardiac Purkinje fibers during voltage clamp hyperpolarization and depolarization: experiments in sodium-free bathing media. *J Gen Physiol* 1977; **70**:149-169.
- Beaumont J, Davidenko N, Davidenko JM, Jalife J. Spiral waves in two-dimensional models of ventricular muscle: formation of a stationary core. *Biophys J* 1998; **75**:1-14.
- Bean BP. Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annu Rev Physiol* 1989; **51**:367-384.
- Beeler GW, Reuter H. Voltage clamp experiments on ventricular myocardial fibres. *J Physiol* 1970; **207**:165-190.
- Beeler GW, Reuter H. Reconstruction of the action potential of ventricular myocardial fibers. *J Physiol* 1977; **268**:177-210.
- Behr ER, Dalageorgou C, Christiansen M, Syrris P, Hughes S, Tome Esteban MT, Rowland E, Jeffery S, McKenna WJ. Sudden arrhythmic death syndrome: familial evaluation identifies inheritable heart disease in the majority of families. *Eur Heart J.* 2008; **29**:1670-80.
- Belousov BP. Periodically acting reaction and its mechanism. *Collection of abstracts on radiation medicine* 1958; 145-147.
- Bennett PB, Yazawa K, Makita N, George AL. Molecular mechanism for an inherited cardiac arrhythmia. *Nature* 1995; **376**:683-685.
- Benson DW, Wang DW, Dymment M, Knilans TK, Fish FA, Strieper MJ, Rhodes TH, George AL Jr. Congenital sick sinus syndrome caused by recessive mutations in the cardiac sodium channel gene (SCN5A). *J Clin Invest* 2003; **112**:1019-1028.
- Berenfeld O, Zaitsev AV, Mironov SF, Pertsov AM, Jalife J. Frequency-dependent breakdown of wave propagation into fibrillatory conduction across the pectinate muscle network in the isolated sheep right atrium. *Circ Res* 2002; **90**:1173-1180.
- Berenfeld O, Jalife J. Mechanisms of Atrial Fibrillation: Rotors, Ionic Determinants and Excitation Frequency. *Cardiol Clin* 2014; **32**: 495-506.
- Berezuk MA, Schroer TA. Dynactin enhances the processivity of kinesin-2. *Traffic.* 2007; **8**:124-9.
- Bers DM, Pérez-Reyes E. Ca<sup>2+</sup> channels in cardiac myocytes: structure and function in Ca<sup>2+</sup> influx and intracellular Ca<sup>2+</sup> release. *Cardiovasc Res* 1999; **42**:339-360.
- Bertaso F, Sharpe CC, Hendry BM, James AF. Expression of voltage-gated K<sup>+</sup> channels in human atrium. *Basic Res Cardiol* 2002; **97**:424-433.
- Bertram PG, Zeng C, Thorson J, Shaw AS, Zheng XF. The 14-3-3 proteins positively regulate rapamycin-sensitive signaling. *Curr Biol.* 1998; **8**:1259-67.
- Beuckelmann DJ, Näbauer M, Erdmann E. Alterations of K<sup>+</sup> currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ Res* 1993; **73**:379-385.
- Bezanilla F. The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol Rev* 2000; **80**:555-592.
- Bezanilla F. Voltage sensor movements. *J Gen Physiol* 2002; **120**:465-473.

## Bibliografía

- Bezzina C, Veldkamp MW, van Den Berg MP, Postma AV, Rook MB, Viersma JW, van Langen IM, Tan-Sindhunata G, Bink-Boelkens MT, van Der Hout AH, Mannens MM, Wilde AA. A single Na<sup>+</sup> channel mutation causing both long-QT and Brugada syndromes. *Circ Res*. 1999;**85**:1206-13.
- Bhargava A, Lin X, Novak P, Mehta K, Korchev Y, Delmar M, Gorelik J. Super-resolution scanning patch clamp reveals clustering of functional ion channels in adult ventricular myocyte. *Circ Res*. 2013;**112**:1112-20.
- Bhat HF, Adams ME, Khanday FA. Syntrophin proteins as Santa Claus: role(s) in cell signal transduction. *Cell Mol Life Sci*. 2013;**70**:2533-54.
- Bianchi L, Roy ML, Tagliatela M, Lundgren DW, Brown AM, Ficker E. Regulation by spermine of native inward rectifier K<sup>+</sup> channels in RBL-1 cells. *J Biol Chem* 1996;**271**:6114-6121.
- Bichet D, Cornet V, Geib S, Carlier E, Volsen S, Hoshi T, Mori Y, De Waard M. The I-II loop of the Ca<sup>2+</sup> channel  $\alpha_1$  subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the  $\beta$  subunit. *Neuron* 2000;**25**:177-190.
- Biermans G, Vereecke J, Carmeliet E. The mechanism of the inactivation of the inward-rectifying K<sup>+</sup> current during hyperpolarizing steps in guinea-pig ventricular myocytes. *Pflügers Arch* 1987;**410**:604-613.
- Bissa Y V, Van Malderen SCh, Keymolen K, Lissens W, Peeters U, Daneels D, Jansen AC, Pappaert G, Brugada P, De Keyser J, Van Dooren S. SCN4A variants and Brugada syndrome: phenotypic and genotypic overlap between cardiac and skeletal muscle sodium channelopathies. *Eur J Hum Genet*. 2016;**24**:400-7.
- Bodi I, Mikala G, Koch SE, Akhter SA, Schwartz A. The L-type calcium channel in the heart: the beat goes on. *J Clin Invest* 2005;**115**:3306-3317.
- Bosch RF, Zeng X, Grammer JB, Popovic K, Mewis C, Kühlkamp V. Ionic mechanisms of electrical remodeling in human atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 1999;**44**:121-131.
- Bowditch H. Über die Eigenthümlichkeiten der Reizbarkeit, welche die Muskel fagern des Herzens zeigen. *Arb Physiol Anstalt* 1871;**6**:139-176.
- Boyett MR. A study of the effect of the rate of stimulation on the transient outward current in the sheep cardiac Purkinje fibres. *J Physiol* 1981;**319**:1-22.
- Braun AP, Fedida D, Giles WR. Activation of  $\alpha_1$ -adrenoceptors modulates the inwardly rectifying potassium currents of mammalian atrial myocytes. *Pflügers Arch* 1992;**421**:431-439.
- Brehm P, Eckert R. Calcium entry leads to inactivation of calcium channel in *Paramecium*. *Science* 1978;**202**:1203-1206.
- Breitwieser GE, Szabo G. Mechanism of muscarinic receptor-induced K<sup>+</sup> channel activation as revealed by hydrolysis-resistant GTP analogues. *J Gen Physiol* 1988;**91**:469-493.
- Brendel J, Peukert S. Blockers of the Kv1.5 channels for treatment of atrial arrhythmias. *Exp Opin Ther Pat* 2002;**12**:1589-1598.
- Brooksby P, Levy AJ, Jones JV. The electrophysiological characteristics of hypertrophied ventricular myocytes from spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens* 1993;**11**:611-622.
- Brown AM, Lee KS, Powell T. Sodium current in single rat heart muscle cells. *J Physiol* 1981;**318**:479-500.
- Brugada P, Brugada J. Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death: a distinct clinical and electrocardiographic syndrome. A multicenter report. *J Am Coll Cardiol* 1992;**20**:1391-1396.
- Brunet S, Aimond F, Li H, Guo W, Eldstrom J, Fedida D, Yamada KA, Nerbonne JM. Heterogeneous expression of repolarizing, voltage-gated K<sup>+</sup> currents in adult mouse ventricles. *J Physiol* 2004;**559**:103-120.
- Burashnikov E, Pfeiffer R, Barajas-Martinez H, Delpón E, Hu D, Desai M, Borggrefe M, Häissaguerre M, Kanter R, Pollevick GD, Guerchicoff A, Laiño R, Marieb M, Nademanee K, Nam GB, Robles R, Schimpf R, Stapleton DD, Viskin S, Winters S, Wolpert C, Zimmern S, Veltmann C, Antzelevitch C. Mutations in the cardiac L-type calcium channel associated with inherited J-wave syndromes and sudden cardiac death. *Heart Rhythm*. 2010;**7**:1872-82.
- Burnashev NA, Zilberter YU I. Two types of single inward rectifying potassium channels in rat myocardial cells. *Gen Physiol Biophys* 1986;**5**:495-504.
- Buraei Z, Yang J. The  $\beta$  subunit of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Physiol Rev*. 2010;**90**:1461-506.
- Caballero R, Moreno I, González T, Valenzuela C, Tamargo J, Delpón E. Putative binding sites for benzocaine on a human cardiac cloned channel (Kv1.5). *Cardiovasc Res* 2002;**56**:104-117.
- Caballero R, Moreno I, González T, Arias C, Valenzuela C, Delpón E, Tamargo J. Spironolactone and its main metabolite, canrenoic acid, block human ether-a-go-go-related gene channels. *Circulation* 2003;**107**:889-895.

- Caballero R, Gómez R, Moreno I, Nuñez L, González T, Arias C, Guizy M, Valenzuela C, Tamargo J, Delpón E. Interaction of angiotensin II with the angiotensin type 2 receptor inhibits the cardiac transient outward potassium current. *Cardiovasc Res*. 2004;**62**:86-95.
- Caballero R Dolz-Gaitón P, Gómez R, Amorós I, Barana A, González de la Fuente M, Osuna L, Duarte J, López-Izquierdo A, Moraleda I, Gálvez E, Sánchez-Chapula JA, Tamargo J, Delpón E. Flecainide increases Kir2.1 currents by interacting with cysteine 311, decreasing the polyamine-induced rectification. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010a ;**107**:15631-6.
- Caballero R, de la Fuente MG, Gómez R, Barana A, Amorós I, Dolz-Gaitón P, Osuna L, Almendral J, Atienza F, Fernández-Avilés F, Pita A, Rodríguez-Roda J, Pinto A, Tamargo J, Delpón E. In humans, chronic atrial fibrillation decreases the transient outward current and ultrarapid component of the delayed rectifier current differentially on each atria and increases the slow component of the delayed rectifier current in both. *J Am Coll Cardiol*. 2010b ;**55**:2346-54.
- Caldarera CM, Orlandini G, Casti A, Moruzzi G. Polyamine and nucleic acid metabolism in myocardial hypertrophy of the overloaded heart. *J Mol Cell Cardiol* 1974;**6**:95-103.
- Cannon SC, Brown RH, Corey DP. A sodium channel defect in hyperkalemic periodic paralysis: potassium induced failure of inactivation. *Neuron* 1991;**6**:619-626.
- Carmeliet E, Vereecke J. Electrogenesis of the action potential. En: *Handbook of Physiology. The Cardiovascular System*. Berne R, Speralakis N, Geiger S. *American Physiological Society* 1979:269-334.
- Carmeliet E, Mubagwa K. Characterization of the acetylcholine-induced potassium current in rabbit cardiac Purkinje fibres. *J Physiol* 1986;**371**:219-237.
- Carmeliet E. Slow inactivation of the sodium current in rabbit cardiac Purkinje fibres. *Pflügers Arch* 1987;**408**:18-26.
- Carmeliet E. Mechanisms and control of repolarization. *Eur Heart J* 1993;**14** (Supp H):3-13.
- Casini S, Tan HL, Bhuiyan ZA, Bezzina CR, Barnett P, Cerbai E, Mugelli A, Wilde AA, Veldkamp MW. Characterization of a novel SCN5A mutation associated with Brugada syndrome reveals involvement of DIIS4-S5 linker in slow inactivation. *Cardiovasc Res*. 2007;**76**:418-29.
- Catterall WA. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 2000;**26**:13-25.
- Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev* 2005a;**57**:397-409.
- Catterall WA, Pérez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev* 2005b;**57**:411-425.
- Catterall WA. Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology. *J Physiol*. 2012;**590**:2577-89.
- Cens T, Mangoni ME, Richard S, Nargeot J, Charnet P. Coexpression of the  $\beta 2$  subunit does not induce voltage-dependent facilitation of the class C L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel. *Pflügers Arch* 1996;**431**:771-774.
- Cerrone M, Noujaim S, Talkachova A, Talkachou A, Berenfeld O, Anumonwo J, Pandit SV, Vikstrom K, Napolitano C, Priori SG, Jalife J. Arrhythmogenic mechanisms in a mouse model of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circ Res*. 2007;**101**:1039-48.
- Cerrone M, Lin X, Zhang M, Agullo-Pascual E, Pfenniger A, Chkourko Gusky H, Novelli V, Kim C, Tirasawadichai T, Judge DP, Rothenberg E, Chen HS, Napolitano C, Priori SG, Delmar M. Missense mutations in plakophilin-2 cause sodium current deficit and associate with a Brugada syndrome phenotype. *Circulation*. 2014;**129**(10):1092-103.
- Chakrabarti S, Wu X, Yang Z, Wu L, Yong SL, Zhang C, Hu K, Wang QK, Chen Q. MOG1 rescues defective trafficking of Na(v)1.5 mutations in Brugada syndrome and sick sinus syndrome. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2013;**6**:392-401.
- Chang BH, Gujral TS, Karp ES, BuKhalid R, Grantcharova VP, MacBeath G. A systematic family-wide investigation reveals that ~30% of mammalian PDZ domains engage in PDZ-PDZ interactions. *Chem Biol*. 2011;**18**:1143-52.
- Chatin B, Colombier P, Gamblin AL, Allouis M, Le Bouffant F. Dynamitin affects cell-surface expression of voltage-gated sodium channel Nav1.5. *Biochem J*. 2014;**463**:339-49.
- Chen C, Cannon SC. Modulation of  $\text{Na}^+$  channel inactivation by the  $\beta 1$  subunit: a deletion analysis. *Pflügers Arch* 1995;**431**:186-195.
- Chen Q, Kirsch GE, Zhang D, Brugada R, Brugada J, Brugada P, Potenza D, Moya A, Borggrefe M, Breithardt G, Ortiz-López R, Wang Z, Antzelevitch C, O'Brien RE, Schulze-Bahr E, Keating MT, Towbin JA,

## Bibliografia

- Wang Q. Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature* 1998;**392**:293-296.
- Chen H, Kim LA, Rajan S, Xu S, Goldstein SA. Charybdotoxin binding in the  $I_{Ks}$  pore demonstrates two minK subunits in each channel complex. *Neuron* 2003a;**40**:15-23.
- Chen YH, Xu SJ, Bendahhou S, Wang XL, Wang Y, Xu WY, Jin HW, Sun H, Su XY, Zhuang QN, Yang YQ, Li YB, Liu Y, Xu HJ, Li XF, Ma N, Mou CP, Chen Z, Barhanin J, Huang W. KCNQ1 gain-of-function mutation in familial atrial fibrillation. *Science* 2003b;**299**:251-254.
- Chen J, Pan L, Wei Z, Zhao Y, Zhang M. Domain-swapped dimerization of ZO-1 PDZ2 generates specific and regulatory connexin43-binding sites. *EMBO J* 2008;**27**:2113-2123.
- Chen Y, Sheng R, Källberg M, Silkov A, Tun MP, Bhardwaj N, Kurilova S, Hall RA, Honig B, Lu H, Cho W. Genome-wide functional annotation of dual-specificity protein- and lipid-binding modules that regulate protein interactions. *Mol Cell*. 2012;**46**:226-37.
- Cheng RC, Tikhonov DB, Zhorov BS. Structural model for phenylalkylamine binding to L-type calcium channels. *J Biol Chem*. 2009;**284**:28332-42.
- Chiamvimonvat N, Chen-Izu Y, Clancy CE, Deschenes I, Dobrev D, Heijman J, Izu L, Qu Z, Ripplinger CM, Vandenberg JJ, Weiss JN, Koren G, Banyasz T, Grandi E, Sanguinetti MC, Bers DM, Nerbonne JM. Potassium currents in the heart: Functional roles in repolarization, arrhythmia and therapeutics. *J Physiol*. 2016. doi:10.1113/JP272883.
- Chimura T, Launey T, Ito M. Evolutionarily conserved bias of amino-acid usage refines the definition of PDZ-binding motif. *BMC Genomics*. 2011;**12**:300.
- Cho HS, Takano M, Noma A. The electrophysiological properties of spontaneously beating pacemaker cells isolated from mouse sinoatrial node. *J Physiol* 2003;**550**:169-180.
- Choe H, Sackin H, Palmer LG. Permeation properties of inward-rectifier potassium channels and their molecular determinants. *J Gen Physiol* 2000;**115**:391-404.
- Choe S. Potassium channel structures. *Nat Rev Neurosci* 2002;**3**:115-121.
- Choi KL, Mossman C, Aube J, Yellen G. The internal quaternary ammonium receptor site of *Shaker* potassium channels. *Neuron* 1993;**10**:533-541.
- Choi BR, Burton F, Salama G. Cytosolic  $Ca^{2+}$  triggers early afterdepolarizations and Torsade de Pointes in rabbit hearts with type 2 long QT syndrome. *J Physiol*. 2002;**543**:615-31.
- Chouabe C, Neyroud N, Guicheney P, Lazdunski M, Romey G, Barhanin J. Properties of KvLQT1  $K^{+}$  channel mutations in Romano-Ward and Jervell and Lange-Nielsen inherited cardiac arrhythmias. *EMBO J* 1997;**16**:5472-5479.
- Christe G. Localization of  $K^{+}$  channels in the tubules of cardiomyocytes as suggested by the parallel decay of membrane capacitance,  $I_{K1}$  and  $I_{K,ATP}$  during culture and by delayed  $I_{K1}$  response to barium. *J Mol Cell Cardiol* 1999;**31**:2207-2213.
- Christie MJ, North RA, Osborne PB, Douglass J, Adelman JP. Heteropolymeric potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes from cloned subunits. *Neuron* 1990;**4**:405-411.
- Clark RB, Sanchez-Chapula J, Salinas-Stefanon E, Duff HJ, Giles WR. Quinidine-induced open channel block of  $K^{+}$  current in rat ventricle. *Br J Pharmacol*. 1995;**115**:335-343.
- Clark RB, Tremblay A, Melnyk P, Allen BG, Giles WR, Fiset C. T-tubule localization of the inward-rectifier  $K^{+}$  channel in mouse ventricular myocytes: a role in  $K^{+}$  accumulation. *J Physiol* 2001;**537**:979-992.
- Clarkson CW, Matsubara T, Hondeghem LM. Slow inactivation of  $V_{max}$  in guinea-pig ventricular myocardium. *Am J Physiol* 1984;**247**:H645-H654.
- Clatot J, Ziyadeh-Isleem A, Maugeenre S, Denjoy I, Liu H, Dilanian G, Hatem SN, Deschênes I, Coulombe A, Guicheney P, Neyroud N. Dominant-negative effect of SCN5A N-terminal mutations through the interaction of Na(v)1.5  $\alpha$ -subunits. *Cardiovasc Res*. 2012;**96**:53-63
- Cohen SA, Levitt LK. Partial characterization of the rH1 sodium channel protein from rat heart using subtype-specific antibodies. *Circ Res*. 1993;**73**:735-42.
- Cohen NA, Brenman JE, Synder SH, Brecht DS. Binding of the inward rectifier  $K^{+}$  channel Kir2.3 to PSD-95 regulated by the protein kinase A phosphorylation. *Neuron* 1996;**17**:759-767.
- Cohen SS. A guide to the polyamines. *Oxford University Press* 1998.
- Collins A, Larson M. Differential sensitivity of inward rectifier  $K^{+}$  channels to metabolic inhibitors. *J Biol Chem* 2002;**277**:35815-35818.
- Comtois P, Kneller J, Nattel S. Of circles and spirals: bridging the gap between the leading circle and spiral

- wave concepts of cardiac reentry. *Europace* 2005; **7** Suppl 2:10-20.
- Comtois P, Sakabe M, Vigmond EJ, Munoz M, Texier A, Shiroshita-Takeshita A y Nattel S. Mechanisms of atrial fibrillation termination by rapidly unbinding Na<sup>+</sup> channel blockers: insights from mathematical models and experimental correlates. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;**295**:H1489–H1504.
- Conti LR, Radeke CM, Shyng SL, Vandenberg CA. Transmembrane topology of the sulfonylurea receptor SUR1. *J Biol Chem* 2001;**276**:41270-41278.
- Cooper PE, Sala-Rabanal M, Lee SJ, Nichols CG. Differential mechanisms of Cantú syndrome-associated gain of function mutations in the ABCC9 (SUR2) subunit of the KATP channel. *J Gen Physiol* 2015;**146**:527-40.
- Coraboeuf E, Otsuka M. L'action des solutions hyposodiques sur les potentiels cellulaires de tissu cardiaque de mammifères. *C R Hebd Seances Acad Sci* 1956;**234**:441-444.
- Coraboeuf E, Carmeliet E. Existence of two transient outward currents in sheep cardiac Purkinje fibers. *Pflügers Arch* 1982;**392**:352-359.
- Cormier JW, Rivolta I, Tateyama M, Yang AS, Kass R. Secondary structure of the human cardiac Na<sup>+</sup> channel C terminus. Evidence for a role of helical structures in modulation of channel inactivation. *J Biol Chem* 2002;**277**:9233-9241.
- Coulombe A, Coraboeuf E. Simulation of potassium accumulation in clefts of Purkinje fibers: effect on membrane electrical activity. *J Theor Biol* 1983;**104**:211-229.
- Covarrubias M, Wei AA, Salkoff L. *Shaker*, *Shal*, *Shab*, and *Shaw* express independent K<sup>+</sup> current systems. *Neuron* 1991;**7**:763-773.
- Cranefield P, Aronson R. *Cardiac Arrhythmias: The role of trigger activity and other mechanisms*. Cranefield & Aronson. *Futura* 1975.
- Cribbs LL, Satin J, Fozzard HA, Rogart RB. Functional expression of the rat heart I Na<sup>+</sup> channel isoform. Demonstration of properties characteristic of native cardiac Na<sup>+</sup> channels. *FEBS Lett*. 1990;**275**:195-200.
- Cunha SR, Mohler PJ. Cardiac ankyrins: Essential components for development and maintenance of excitable membrane domains in heart. *Cardiovasc Res*. 2006;**71**:22-9.
- Daimi H, Lozano-Velasco E, Haj Khelil A, Chibani JB, Barana A, Amorós I, González de la Fuente M, Caballero R, Aranega A, Franco D. Regulation of SCN5A by microRNAs: miR-219 modulates SCN5A transcript expression and the effects of flecainide intoxication in mice. *Heart Rhythm*. 2015;**12**:1333-42.
- Daniels DL, Cohen AR, Anderson JM, Brünger AT. Crystal structure of the hCASK PDZ domain reveals the structural basis of class II PDZ domain target recognition. *Nat Struct Biol*. 1998;**5**:317-25.
- Darbar D, Kannankeril PJ, Donahue BS, Kucera G, Stubblefield T, Haines JL, George AL Jr, Roden DM. Cardiac sodium channel (SCN5A) variants associated with atrial fibrillation. *Circulation* 2008;**117**:1927-1935.
- Dascal N, Schreibmayer W, Lim NF, Wang W, Chavkin C, Dimagno L, Labarca C, Kieffer BL, Gaveriaux-Ruff C, Trollinger D, Lester HA, Davidson N. Atrial G protein-activated K<sup>+</sup> channel: Expression cloning and molecular properties. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;**90**:10235-10239.
- Davidenko JM, Kent PF, Chialvo DR, Michaels DC, Jalife J. Sustained vortex-like waves in normal isolated ventricular muscle. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;**87**:8785–8789.
- De Waard M, Pragnell M, Campbell KP. Ca<sup>2+</sup> channel regulation by a conserved  $\beta$  subunit domain. *Neuron* 1994;**13**:495-503.
- Deacon SW, Serpinskaya AS, Vaughan PS, Lopez Fanarraga M, Vernos I, Vaughan KT, Gelfand VI. Dynactin is required for bidirectional organelle transport. *J Cell Biol*. 2003;**160**:297-301.
- Decher N, Uyguner O, Scherer CR, Karaman B, Yuksel-Apak M, Busch AE, Steinmeyer K, Wollnik B. hKChIP2 is a functional modifier of hKv4.3 potassium channels: cloning and expression of a short hKChIP2 splice variant. *Cardiovasc Res* 2001;**52**:255-264.
- Decher N, Renigunta V, Zuzarte M, Soon M, Heinemann SH, Timothy KW, Keating MT, Daut J, Sanguinetti MC, Splawski I. Impaired interaction between the slide helix and the C-terminus of Kir2.1: A novel mechanism of Andersen syndrome. *Cardiovasc Res* 2007;**75**:748-757.
- Delpón E, Valenzuela C, Pérez O, Casis O, Tamargo J. Propafenone preferentially blocks the rapidly activating component of delayed rectifier K<sup>+</sup> current in guinea pig ventricular myocytes. Voltage-independent and time-dependent block of the slowly activating component. *Circ Res* 1995;**76**:223-235.
- Delpón E, Tamargo J. Electrofisiología cardíaca. En: *Fisiología Humana*. Tresguerres JAF. *McGraw-Hill* 2005:450-562.

## Bibliografía

- Delpón E, Cordeiro JM, Núñez L, Thomsen PE, Guerchicoff A, Pollevick GD, Wu Y, Kanters JK, Larsen CT, Hofman-Bang J, Burashnikov E, Christiansen M, Antzelevitch C. Functional effects of KCNE3 mutation and its role in the development of Brugada Syndrome. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2008;**1**:209-218.
- Deo M, Ruan Y, Pandit SV, Shah K, Berenfeld O, Blaufox A, Cerrone M, Noujaim SF, Denegri M, Jalife J, Priori SG. KCNJ2 mutation in short QT syndrome 3 results in atrial fibrillation and ventricular proarrhythmia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;**110**:4291-6.
- Deschênes I, Tomaselli GF. Modulation of Kv4.3 current by accessory subunits. *FEBS Lett* 2002;**528**:183-188.
- Detta N, Frisso G, Salvatore F. The multi-faceted aspects of the complex cardiac Nav1.5 protein in membrane function and pathophysiology. *Biochim Biophys Acta*. 2015;**1854**:1502-9.
- Dhamoon AS, Pandit SV, Sarmast F, Parisian KR, Guha P, Li Y, Bagwe S, Taffet SM, Anumonwo JM. Unique Kir2.x properties determine regional and species differences in the cardiac inward rectifier K<sup>+</sup> current. *Circ Res* 2004;**94**:1332-1339.
- Dhamoon AS, Jalife J. The inward rectifier current ( $I_{K1}$ ) controls cardiac excitability and is involved in arrhythmogenesis. *Heart Rhythm* 2005;**2**:316-324.
- Diaz RJ, Zobel C, Cho HC, Batthish M, Hinek A, Backx PH, Wilson GJ. Selective inhibition of inward rectifier K<sup>+</sup> channels (Kir2.1 or Kir2.2) abolishes protection by ischemic preconditioning in rabbit ventricular cardiomyocytes. *Circ Res* 2004;**95**:325-332.
- DiFrancesco D, Ferroni A, Visentin S. Barium-induced blockade of the inward rectifier in calf Purkinje fibres. *Pflügers Arch* 1984;**402**:446-453.
- Dilks D, Ling HP, Cockett M, Sokol P, Numann R. Cloning and expression of the human Kv4.3 potassium channel. *J Neurophysiol* 1999;**81**:1974-1977.
- Dittrich HC, Pearce LA, Asinger RW, McBride R, Webel R, Zabalgaitia M, Pennock GD, Safford RE, Rothbart RM, Halperin JL, Hart RG. Left atrial diameter in nonvalvular atrial fibrillation: An echocardiographic study. Stroke Prevention in Atrial Fibrillation Investigators. *Am Heart J*. 1999;**137**:494-9.
- Dixon JE, Shi W, Wang HS, McDonald C, Yu H, Wymore RS, Cohen IS, McKinnon D. The role of the Kv4.3 K<sup>+</sup> channel in ventricular muscle. A molecular correlate for the transient outward current. *Circ Res* 1996;**79**:659-668.
- Djurovic S, Iversen N, Jeansson S, Hoover F, Christensen G. Comparison of nonviral transfection and adeno-associated viral transduction on cardiomyocytes. *Mol Biotechnol*. 2004;**28**:21-32.
- Dobrev D, Graf E, Wettwer E, Himmel HM, Hala O, Doerfel C, Christ T, Schuler S, Ravens U. Molecular basis of downregulation of G-protein-coupled inward rectifying K<sup>+</sup> current ( $I_{K,ACH}$ ) in chronic human atrial fibrillation: decrease in GIRK4 mRNA correlates with reduced  $I_{K,ACH}$  and muscarinic receptor-mediated shortening of action potentials. *Circulation* 2001;**104**:2551-2557.
- Dobrev D, Wettwer E, Kortner A, Knaut M, Schuler S, Ravens U. Human inward rectifier potassium channels in chronic and postoperative atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2002;**54**:397-404.
- Dobrev D, Friedrich A, Voigt N, Jost N, Wettwer E, Christ T, Knaut M, Ravens U. The G protein-gated potassium current  $I_{K,ACH}$  is constitutively active in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation* 2005;**112**:3697-3706.
- Dolz-gaitón P, Núñez M, Núñez L, Barana A, Amorós I, Matamoros M, Pérez-Hernández M, González de la Fuente M, Alvarez-López M, Macías-Ruiz R, Tercedor-Sánchez L, Jiménez-Jáimez J, Delpón E, Caballero R, Tamargo J. Functional characterization of a novel frameshift mutation in the C-terminus of the Nav1.5 channel underlying a Brugada syndrome with variable expression in a Spanish family. *PLoS One*. 2013;**8**:e81493.
- Domene C, Haider S, Sansom M. Ion channels structures: a review of recent progress. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2003;**6**:611-619.
- Donaldson MR, Jensen JL, Tristani-Firouzi M, Tawil R, Bendahhou S, Suarez WA, Cobo AM, Poza JJ, Behr E, Wagstaff J, Szepietowski P, Pereira S, Mozaffar T, Escolar DM, Fu YH, Ptacek LJ. PIP<sub>2</sub> binding residues of Kir2.1 are common targets of mutations causing Andersen syndrome. *Neurology* 2003;**60**:1811-1816.
- Döring F, Derst C, Wischmeyer E, Karschin C, Schneggenburger R, Daut J, Karschin A. The epithelial inward rectifier channel Kir7.1 displays unusual K<sup>+</sup> permeation properties. *J Neurosci* 1998;**18**:8625-8636.
- Dobrev D, Graf E, Wettwer E, Himmel HM, Hala O, Doerfel C, Christ T, Schuler S, Ravens U. Molecular basis of downregulation of G-protein-coupled inward rectifying K<sup>+</sup> current ( $I_{K,ACH}$ ) in chronic human atrial fibrillation: decrease in GIRK4 mRNA correlates with reduced  $I_{K,ACH}$  and muscarinic receptor-mediated shortening of action potentials. *Circulation* 2001;**104**:2551-2557.

- Doyle DA, Lee A, Lewis J, Kim E, Sheng M, MacKinnon R. Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ. *Cell* 1996;**85**:1067-76.
- Doyle DA, Morais-Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R. The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science* 1998;**280**:69-77.
- Dumaine R, Wang Q, Keating M, Hartmann H, Schwartz P, Brown A, Kirsch G. Multiple mechanisms of Na<sup>+</sup> channel-linked long-QT syndrome. *Circ Res* 1996;**78**:916-924.
- Eaholtz G, Scheuer T, Catterall WA. Restoration of inactivation and block of open sodium channels by an inactivation gate peptide. *Neuron* 1994;**12**:1041-1048.
- Eckhardt LL, Farley AL, Rodríguez E, Ruwaldt K, Hammill D, Tester DJ, Ackerman MJ, Makielski JC. KCNJ2 mutations in arrhythmia patients referred for LQT testing: a mutation T305A with novel effect on rectification properties. *Heart Rhythm* 2007;**4**:323-329.
- Ehmsen J, Poon E, Davies K. The dystrophin-associated protein complex. *J Cell Sci*. 2002;**115**:2801-3.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 2001;**411**:494-8.
- Eldstrom J, Choi WS, Steele DF, Fedida D. SAP97 increases Kv1.5 currents through an indirect N-terminal mechanism. *FEBS Lett*. 2003;**547**:205-11.
- Ellinor PT, Nam EG, Shea MA, Milan DJ, Ruskin JN, MacRae CA. Cardiac sodium channel mutation in atrial fibrillation. *Heart Rhythm* 2008;**5**:99-105.
- Ernst A, Gfeller D, Kan Z, Seshagiri S, Kim PM, Bader GD, Sidhu SS. Coevolution of PDZ domain-ligand interactions analyzed by high-throughput phage display and deep sequencing. *Mol Biosyst*. 2010;**6**:1782-90.
- Escande D, Coulombe A, Faivre JF, Deroubaix E, Coraboeuf E. Two types of transient outward currents in adult human atrial cells. *Am J Physiol* 1987;**252**:H142-H148.
- Fakler B, Braendle U, Bond C, Glowatzki E, König C, Adelman JP, Zenner HP, Ruppersberg JP. A structural determinant of differential sensitivity of cloned inward rectifier K<sup>+</sup> channels to intracellular spermine. *FEBS Lett* 1994;**356**:199-203.
- Fakler B, Braendle U, Glowatzki E, Weidemann S, Zenner HP, Ruppersberg JP. Strong voltage-dependent inward rectification of inward rectifier K<sup>+</sup> channels is caused by intracellular spermine. *Cell* 1995;**80**:149-154.
- Fakler B, Bond CT, Adelman JP, Ruppersberg JP. Heterooligomeric assembly of inward-rectifier K<sup>+</sup> channels from subunits of different subfamilies: Kir2.1 (IRK1) and Kir4.1 (BIR10). *Pflügers Arch* 1996a;**433**:77-83.
- Fakler B, Schultz JH, Yang J, Schulte U, Brandle U, Zenner HP, Jan LY, Ruppersberg JP. Identification of a titratable lysine residue that determines sensitivity of kidney potassium channels (ROMK) to intracellular pH. *EMBO J* 1996b;**15**:4093-4099.
- Fan Z, Makielski JC. Anionic phospholipids activate ATP-sensitive potassium channels. *J Biol Chem* 1997;**272**:5388-5395.
- Fast VG, Kleber AG. Role of wavefront curvature in propagation of cardiac impulse. *Cardiovasc Res* 1997;**33**:258-271.
- Fatkin D; members of the CSANZ Cardiac Genetic Diseases Council Writing Group. Guidelines for the diagnosis and management of familial dilated cardiomyopathy. *Heart Lung Circ*. 2011;**20**:691-3.
- Fauconnier J, Lacampagne A, Rauzier JM, Vassort G, Richard S. Ca<sup>2+</sup>-dependent reduction of I<sub>K1</sub> in rat ventricular cells: a novel paradigm for arrhythmia in heart failure? *Cardiovasc Res* 2005;**68**:204-212.
- Fedida D, Braun AP, Giles WR.  $\alpha_1$ -Adrenoceptors reduce background K<sup>+</sup> current in rabbit ventricular myocytes. *J Physiol* 1991;**441**:673-684.
- Fedida D, Wible B, Wang Z, Fermi B, Faust F, Nattel S, Brown AM. Identity of a novel delayed rectifier current from human heart with a cloned K<sup>+</sup> channel current. *Circ Res* 1993;**73**:210-216.
- Feng J, Xu D, Wang Z, Nattel S. Ultrarapid delayed rectifier current inactivation in human atrial myocytes: Properties and consequences. *Am J Physiol* 1998a;**275**:H1717-H1725.
- Feng J, Yue L, Wang Z, Nattel S. Ionic mechanisms of regional action potential heterogeneity in the canine right atrium. *Circ Res* 1998b;**83**:541-551.
- Fermi B, Wang Z, Duan D, Nattel S. Difference in rate dependence of transient outward current in rabbit and human atrium. *Am J Physiol* 1992;**263**:H1747-H1754.
- Ficker E, Taglialatela M, Wible BA, Henley CM, Brown AM. Spermine and spermidine as gating molecules for inward rectifier K<sup>+</sup> channels. *Science* 1994;**266**:1068-1072.

## Bibliografía

- Filgueiras-Rama D, Martins RP, Mironov S, Yamazaki M, Calvo CJ, Ennis SR, Bandaru K, Noujaim SF, Kalifa J, Berenfeld O, Jalife J. Chloroquine terminates stretch-induced atrial fibrillation more effectively than flecainide in the sheep heart. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2012;**5**:561-70.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 1998;**391**:806-11.
- Foster MN, Coetzee WA. KATP Channels in the Cardiovascular System. *Physiol Rev.* 2016;**96**:177-252.
- Fourie C, Li D, Montgomery JM. The anchoring protein SAP97 influences the trafficking and localisation of multiple membrane channels. *Biochim Biophys Acta.* 2014;**1838**:589-94.
- Fozzard HA, January CT, Makielski JC. New studies of the excitatory sodium currents in heart muscle. *Circ Res* 1985;**56**:475-485.
- Fozzard HA, Hanck DA, Makielski JC, Scanley BE, Sheets MF. Sodium channels in cardiac Purkinje cells. *Experientia* 1987;**43**:1162-1168.
- Franqueza L, Longobardo M, Vicente J, Delpón E, Tamkun MM, Tamargo J, Snyders DJ, Valenzuela C. Molecular determinants of stereoselective bupivacaine block of hKv1.5 channels. *Circ Res* 1997;**81**:1053-1064.
- Fredriksson S, Gullberg M, Jarvius J, Olsson C, Pietras K, Gústafsdóttir SM, Ostman A, Landegren U. Protein detection using proximity-dependent DNA ligation assays. *Nat Biotechnol.* 2002;**20**:473-7.
- Fujiwara Y, Kubo Y. Functional roles of charged amino acid residues on the wall of the cytoplasmic pore of Kir2.1. *J Gen Physiol* 2006;**127**:401-419.
- Furukawa T, Kimura S, Furukawa N, Bassett AL, Myerburg RJ. Potassium rectifier currents differ in myocytes of endocardial and epicardial origin. *Circ Res* 1992;**70**:91-103.
- Furukawa T, Bassett AL, Furukawa N, Kimura S, Myerburg RJ. The ionic mechanism of reperfusion-induced early afterdepolarizations in feline left ventricular hypertrophy. *J Clin Invest* 1993;**91**:1521-1531.
- Fuster V, Rydén LE, Cannom DS, Crijns HJ, Curtis AB, Ellenbogen KA, Halperin JL, Le Heuzey JY, Kay GN, Lowe JE, Olsson SB, Prystowsky EN, Tamargo JL, Wann S, Smith SC Jr, Jacobs AK, Adams CD, Anderson JL, Antman EM, Halperin JL, Hunt SA, Nishimura R, Ornato JP, Page RL, Riegel B, Priori SG, Blanc JJ, Budaj A, Camm AJ, Dean V, Deckers JW, Despres C, Dickstein K, Lekakis J, McGregor K, Metra M, Morais J, Osterspey A, Tamargo JL, Zamorano JL; American College of Cardiology; American Heart Association Task Force; European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines; European Heart Rhythm Association; Heart Rhythm Society. ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for the management of patients with atrial fibrillation. *Circulation* 2006; **114**: e257-354.
- Gaborit N, Steenman M, Lamirault G, Le Meur N, Le Bouter S, Lande G, Leger J, Charpentier F, Christ T, Dobrev D, Escande D, Nattel S, Demolombe S. Human atrial ion channel and transporter subunit gene-expression remodeling associated with valvular heart disease and atrial fibrillation. *Circulation* 2005;**112**:471-481.
- Gaborit N, Le Bouter S, Szuts V, Varro A, Escande D, Nattel S, Demolombe S. Regional and tissue specific transcript signatures of ion channel genes in the non-diseased human heart. *J Physiol* 2007;**582**:675-693.
- Gallardo R, Ivarsson Y, Schymkowitz J, Rousseau F, Zimmermann P. Structural diversity of PDZ-lipid interactions. *Chembiochem.* 2010;**11**:456-67.
- Garneau L, Klein H, Parent L, Sauvé R. Contribution of cytosolic cysteine residues to the gating properties of the Kir2.1 inward rectifier. *Biophys J* 2003;**84**:3717-3729.
- Garrey WE. Auricular fibrillation. *Physiol Rev* 1924; **4**:215-50.
- Gavillet B, Rougier JS, Domenighetti AA, Behar R, Boixel C, Ruchat P, Lehr HA, Pedrazzini T, Abriel H. Cardiac sodium channel Nav1.5 is regulated by a multiprotein complex composed of syntrophins and dystrophin. *Circ Res.* 2006;**99**:407-14.
- Gee SH, Madhavan R, Levinson SR, Caldwell JH, Sealock R, Froehner SC. Interaction of muscle and brain sodium channels with multiple members of the syntrophin family of dystrophin-associated proteins. *J Neurosci.* 1998a;**18**:128-37.
- Gee SH, Sekely SA, Lombardo C, Kurakin A, Froehner SC, Kay BK. Cyclic peptides as non-carboxyl-terminal ligands of syntrophin PDZ domains. *J Biol Chem.* 1998b;**273**:21980-7.
- Gee SH, Quenneville S, Lombardo CR, Chabot J. Single-amino acid substitutions alter the specificity and affinity of PDZ domains for their ligands. *Biochemistry.* 2000;**39**:14638-46.
- Gee HY, Noh SH, Tang BL, Kim KH, Lee MG. Rescue of  $\Delta$ F508-CFTR trafficking via a GRASP-dependent

- unconventional secretion pathway. *Cell*. 2011;**146**:746-60.
- Gellens ME, George AL Jr, Chen LQ, Chahine M, Horn R, Barchi RL, Kallen RG. Primary structure and functional expression of the human cardiac tetrodotoxin-insensitive voltage-dependent sodium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;**89**:554-8.
- George AL Jr. Inherited disorders of voltage-gated sodium channels. *J Clin Invest* 2005;**115**:1990-1999.
- Giles WR, IMAIZUMI Y. Comparison of potassium currents in rabbit atrial and ventricular cells. *J Physiol* 1988;**405**:123-145.
- Gillet L, Rougier JS, Shy D, Sonntag S, Mougnot N, Essers M, Shmerling D, Balse E, Hatem SN, Abriel H. Cardiac-specific ablation of synapse-associated protein SAP97 in mice decreases potassium currents but not sodium current. *Heart Rhythm*. 2015;**12**:181-92.
- Gintant GA, Dwyer NB, Cohen IS. Slow inactivation of a tetrodotoxin-sensitive current in canine cardiac Purkinje fibers. *Biophys J* 1984;**45**:509-512.
- Godreau D, Vranckx R, Maguy A, Goyenville C, Hatem SN. Different isoforms of synapse-associated protein, SAP97, are expressed in the heart and have distinct effects on the voltage-gated K<sup>+</sup> channel Kv1.5. *J Biol Chem*. 2003;**278**:47046-52.
- Goedhart J, von Stetten D, Noirclerc-Savoye M, Lelimosin M, Joosen L, Hink MA, van Weeren L, Gadella TW Jr, Royant A. Structure-guided evolution of cyan fluorescent proteins towards a quantum yield of 93%. *Nat Commun*. 2012;**3**:751.
- Goldman DE. Potential, impedance, and rectification in membranes. *J Gen Physiol* 1943;**27**:37-60.
- Gómez R, Núñez L, Caballero R, Vaquero M, Tamargo J, Delpón E. Spironolactone and its main metabolite canrenoic acid, block hKv1.5, Kv4.3 and Kv7.1+minK channels. *Br J Pharmacol* 2005;**146**:146-161.
- Gómez R, Caballero R, Barana A, Amorós I, Calvo E, López JA, Klein H, Vaquero M, Osuna L, Atienza F, Almendral J, Pinto A, Tamargo J, Delpón E. Nitric oxide increases cardiac IK1 by nitrosylation of cysteine 76 of Kir2.1 channels. *Circ Res*. 2009;**105**:383-92.
- Gómez R, Núñez L, Vaquero M, Amorós I, Barana A, de Prada T, Macaya C, Maroto L, Rodríguez E, Caballero R, López-Farré A, Tamargo J, Delpón E. Nitric oxide inhibits Kv4.3 and human cardiac transient outward potassium current ( $I_{to1}$ ). *Cardiovasc Res* 2008;**80**:375-384.
- Gómez R, Caballero R, Barana A, Amorós I, De Palm SH, Matamoros M, Núñez M, Pérez-Hernández M, Iriepa I, Tamargo J, Delpón E. Structural basis of drugs that increase cardiac inward rectifier Kir2.1 currents. *Cardiovasc Res*. 2014;**104**:337-46.
- González de la Fuente M, Barana A, Gómez R, Amorós I, Dolz-Gaitón P, Sacristán S, Atienza F, Pita A, Pinto A, Fernández-Avilés F, Caballero R, Tamargo J, Delpón E. Chronic atrial fibrillation up-regulates  $\beta$ 1-Adrenoceptors affecting repolarizing currents and action potential duration. *Cardiovasc Res*. 2013;**97**:379-88.
- Gorostiza P, Guarner V, Cárdenas M, Valenzuela F. Effects of  $\alpha$ -adrenergic stimulation on time independent potassium current of isolated ventricular myocytes. *Life Sci* 1995;**56**:1407-1414.
- Goult BT, Rapley JD, Dart C, Kitmitto A, Grossmann JG, Leyland ML, Lian LY. Small-angle X-ray scattering and NMR studies of the conformation of the PDZ region of SAP97 and its interactions with Kir2.1. *Biochemistry* 2007;**46**:14117-28.
- Grandi E, Sanguinetti MC, Bartos DC, Bers DM, Chen-Izu Y, Chiamvimonvat N, Colecraft HM, Delisle BP, Heijman J, Navedo MF, Noskov S, Proenza C, Vandenberg JI, Yarov-Yarovoy V. Potassium channels in the heart: structure, function and regulation. *J Physiol*. 2016. doi: 10.1113/JP272864.
- Grant AO, Carboni MP, Neplioueva V, Starmer CF, Memmi M, Napolitano C, Priori S. Long QT syndrome, Brugada syndrome, and conduction system disease are linked to a single sodium channel mutation. *J Clin Invest* 2002;**110**:1201-1209.
- Grant AO. Basic Science for the Clinical Electrophysiologist. Cardiac Ion Channels. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*. 2009;**2**:185-194.
- Groenewegen WA, Firouzi M, Bezzina CR, Vliex S, Van Langen IM, Sandkuijl L, Smits JP, Hulsbeek M, Rook MB, Jongasma HJ, Wilde AA. A cardiac sodium channel mutation cosegregates with a rare connexin 40 genotype in familial atrial standstill. *Circ Res* 2003;**92**:14-22.
- Gullberg M, Huang S, Andersson AC. Analyzing human epidermal growth factor receptor family dimerization and activation using Duolink<sup>®</sup>. *Nature Methods* 2010 ;**7**.
- Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stuhmer W, Wang X. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev* 2005;**57**:473-508.

## Bibliografia

- Haghnia M, Cavalli V, Shah SB, Schimmelpfeng K, Brusch R, Yang G, Herrera C, Pilling A, Goldstein LS. Dynactin is required for coordinated bidirectional motility, but not for dynein membrane attachment. *Mol Biol Cell*. 2007;**18**:2081-9.
- Hagiwara N, Irisawa H, Kameyama M. Contributions of two types of calcium currents to the pacemaker potential of rabbit sino-atrial node cells. *J Physiol* 1988;**359**:233-253.
- Hall AE, Hutter OF, Noble D. Current-voltage relations in Purkinje fibres in sodium-deficient solutions. *J Physiol* 1963;**166**:225-240.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 1981;**391**:85-100.
- Hamilton AJ, Baulcombe DC. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 1999;**286**:950-2.
- Hancox JC, Levi AJ, Witchel HJ. Time course and voltage dependence of expressed HERG current compared with native "rapid" delayed rectifier K<sup>+</sup> current during the cardiac ventricular action potential. *Pflügers Arch* 1998;**436**:843-853.
- Hansen SB, Tao X, MacKinnon R. Structural basis of PIP<sub>2</sub> activation of the classical inward rectifier K<sup>+</sup> channel Kir2.2. *Nature* 2011;**477**:495-8.
- Hansen SB. Lipid agonism: The PIP<sub>2</sub> paradigm of ligand-gated ion channels. *Biochim Biophys Acta*. 2015; **1851**:620-8.
- Hassinen M, Paajanen V, Vornanen M. A novel inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel, Kir2.5, is upregulated under chronic cold stress in fish cardiac myocytes. *J Exp Biol* 2008;**211**:2162-2171.
- Hattori T, Makiyama T, Akao M, Ehara E, Ohno S, Iguchi M, Nishio Y, Sasaki K, Itoh H, Yokode M, Kita T, Horie M, Kimura T. A novel gain-of-function KCNJ2 mutation associated with short-QT syndrome impairs inward rectification of Kir2.1 currents. *Cardiovasc Res*. 2012;**93**:666-73.
- Haworth RA, Hunter DR, Berkoff HA. The isolation of Ca<sup>2+</sup>-resistant myocytes from the adult rat. *J Mol Cell Cardiol*. 1980;**12**:715-23.
- Heginbotham L, Lu Z, Abramson R, MacKinnon R. Mutations in the K<sup>+</sup> channel signature sequence. *Biophys J* 1994;**66**:1061-1067.
- Heinemann SH, Terlau H, Stühmer W, Imoto K, Numa S. Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature* 1992;**356**:441-443.
- Hennessey JA, Marcou CA, Wang C, Wei EQ, Wang C, Tester DJ, Torchio M, Dagradi F, Crotti L, Schwartz PJ, Ackerman MJ, Pitt GS. FGF12 is a candidate Brugada syndrome locus. *Heart Rhythm*. 2013;**10**:1886-94.
- Henry PC, Kanelis V, O'Brien MC, Kim B, Gautschi I, Forman-Kay J, Schild L, Rotin D. Affinity and specificity of interactions between Nedd4 isoforms and the epithelial Na<sup>+</sup> channel. *J Biol Chem*. 2003;**278**:20019-28.
- Herskowitz I. Functional inactivation of genes by dominant negative mutations. *Nature*. 1987;**329**:219-22.
- Herren AW, Weber DM, Rigor RR, Margulies KB, Phinney BS, Bers DM. CaMKII Phosphorylation of Na(V)1.5: Novel in Vitro Sites Identified by Mass Spectrometry and Reduced S516 Phosphorylation in Human Heart Failure. *J Proteome Res*. 2015;**14**:2298-311.
- Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiological Reviews* 2010;**90**:291-366.
- Hilgemann DW, BALL R. Regulation of cardiac Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange and K<sub>ATP</sub> potassium channels by PIP<sub>2</sub>. *Science* 1996;**273**:956-959.
- Hilgemann DW. Cytoplasmic ATP-dependent regulation of ion transporters and channels: mechanisms and messengers. *Annu Rev Physiol* 1997;**59**:193-220.
- Hilgemann DW, Feng S, Nasuhoglu C. The complex and intriguing lives of PIP<sub>2</sub> with ion channels and transporters. *Sci STKE* 2001;**2001**(111):RE19.
- Hille B. *Ion channels of excitable membranes*. Hille B. Sinauer 2001.
- Hillier BJ, Christopherson KS, Prehoda KE, Brecht DS, Lim WA. Unexpected modes of PDZ domain scaffolding revealed by structure of nNOS-syntrophin complex. *Science*. 1999;**284**:812-5.
- Hiraoka M, Kawano S. Calcium-sensitive and insensitive transient outward current in rabbit ventricular myocytes. *J Physiol* 1989;**410**:187-212.
- Hirschberg B, Rovner A, Lieberman M, Patlak J. Transfer of twelve charges is needed to open skeletal muscle Na<sup>+</sup> channels. *J Gen Physiol* 1995;**106**:1053-1068.
- Ho K, Nichols CG, Lederer WJ, Lytton J, Vassilev PM, Kanazirska MV, Hebert SC. Cloning and expression of

- an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature* 1993;**362**:31-38.
- Hocini M, Nault I, Wright M, Veenhuyzen G, Narayan SM, Jaïs P, Lim KT, Knecht S, Matsuo S, Forclaz A, Miyazaki S, Jadidi A, O'Neill MD, Sacher F, Clémenty J, Haïssaguerre M. Disparate evolution of right and left atrial rate during ablation of long lasting persistent atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 2010; **55**:1007-1016.
- Hodgkin AL, Katz B. The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. *J Physiol* 1949;**108**:37-77.
- Hodgkin AL, Huxley AF. The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. *J Physiol* 1952a;**116**:473-496.
- Hodgkin AL, Huxley AF. A quantitative description of membrane current and its application to induction and excitation in nerve. *J Physiol* 1952b;**117**:500-544.
- Hoffman B, Cranefield P. *Electrophysiology of the heart*. Hoffman B, Cranefield P. McGraw-Hill 1960.
- Hofmann F, Biel M, Flockerzi V. Molecular basis for Ca<sup>2+</sup> channel diversity. *Annu Rev Neurosci* 1994;**17**:399-418.
- Hondeghem LM, Katzung BG. Time- and voltage-dependent interactions of antiarrhythmic drugs with cardiac sodium channels. *Biochim Biophys Acta* 1977;**472**:373-398.
- Hondeghem LM. Validity of  $V_{max}$  as a measure of the sodium current in cardiac and nervous tissues. *Biophys J* 1978;**23**:147-152.
- Horie M, Irisawa H, Noma A. Voltage-dependent magnesium block of adenosine-triphosphate-sensitive potassium channel in guinea-pig ventricular cells. *J Physiol* 1987;**387**:251-272.
- Horn R, Patlak J, Stevens CF. Sodium channels need not open before they inactivate. *Nature* 1981;**291**:426-427.
- Hu D, Barajas-Martínez H, Burashnikov E, Springer M, Wu Y, Varro A, Pfeiffer R, Koopmann TT, Cordeiro JM, Guerchicoff A, Pollevick GD, Antzelevitch C. A mutation in the  $\beta_3$  subunit of the cardiac sodium channel associated with Brugada ECG phenotype. *Circ Cardiovasc Genet* 2009;**2**:270-278.
- Hu D, Barajas-Martínez H, Pfeiffer R, Dezi F, Pfeiffer J, Buch T, Betzenhauser MJ, Belardinelli L, Kahlig KM, Rajamani S, DeAntonio HJ, Myerburg RJ, Ito H, Deshmukh P, Marieb M, Nam GB, Bhatia A, Hasdemir C, Haïssaguerre M, Veltmann C, Schimpf R, Borggreffe M, Viskin S, Antzelevitch C. Mutations in SCN10A are responsible for a large fraction of cases of Brugada syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 2014 Jul 8;**64**:66-79.
- Huang CL, Slesinger PA, Casey PJ, Jan NY, Jan LY. Evidence that direct binding of G $\beta\gamma$  to the GIRK1 G protein-gated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel is important for channel activation. *Neuron* 1995;**15**:1133-1143.
- Huang CL, Feng S, Hilgemann DW. Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP<sub>2</sub> and its stabilization by G $\beta\gamma$ . *Nature* 1998;**391**:803-806.
- Huang Y, Wang Z, Liu Y, Xiong H, Zhao Y, Wu L, Yuan C, Wang L, Hou Y, Yu G, Huang Z, Xu C, Chen Q, Wang QK.  $\alpha$ B-Crystallin Interacts with Nav1.5 and Regulates Ubiquitination and Internalization of Cell Surface Nav1.5. *J Biol Chem*. 2016;**291**:11030-41.
- Hughes BA, Kumar G, Yuan Y, Swaminathan A, Yan D, Sharma A, Plumley L, Yang-Feng TL, Swaroop A. Cloning and functional expression of human retinal Kir2.4, a pH-sensitive inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel. *Am J Physiol* 2000;**279**:C771-C784.
- Hurd TW, Gao L, Roh MH, Macara IG, Margolis B. Direct interaction of two polarity complexes implicated in epithelial tight junction assembly. *Nat Cell Biol*. 2003;**5**:137-42.
- Hutter OF, Noble D. Rectifying properties of cardiac muscle. *Nature* 1960;**188**:495.
- Inanobe A, Fujita A, Ito M, Tomoike H, Inageda K, Kurachi Y. Inwardly rectifier K<sup>+</sup> channel Kir2.3 is localized at the postsynaptic membrane of excitatory synapses. *Am J Physiol* 2002;**282**:C1396-C1403.
- Inomata N, Ohno T, Ishihara T, Akaike N. Antiarrhythmic agents act differently on the activation phase of the ACh-response in guineapig atrial myocytes. *Br J Pharmacol* 1993;**108**:111-115.
- Ishihara K. Time-dependent outward currents through the inward rectifier potassium channel IRK1. The role of weak blocking effects. *J Gen Physiol* 1997;**109**:229-243.
- Ishihara K, Ehara T. A repolarization-induced transient increase in the outward current of the inward rectifier K<sup>+</sup> channel in guinea-pig cardiac myocytes. *J Physiol* 1998;**510**:755-771.
- Ishii K, Yamagishi T, Taira N. Cloning and functional expression of a cardiac inward rectifier K<sup>+</sup> channel. *FEBS Letters* 1994;**338**:107-111.
- Isom LL, Catterall WA. Na<sup>+</sup> channel subunits and Ig domains. *Nature* 1996;**383**:307-308.

## Bibliografia

- Ito H, Takikawa R, Kurachi Y, Sugimoto T. Anti-cholinergic effect of verapamil on the muscarinic acetylcholine receptor-gated K1 channel in isolated guinea-pig atrial myocytes. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1989;**339**:244-246.
- Ito H, Vereecke J, Carmeliet E. Intracellular protons inhibit inward rectifier K<sup>+</sup> channel of guinea-pig ventricular cell membrane. *Pflügers Arch* 1992;**422**:280-286.
- Ivarsson Y. Plasticity of PDZ domains in ligand recognition and signaling. *FEBS Lett.* 2012;**586**:2638-47.
- Iwata Y, Shigekawa M, Wakabayashi S. Cardiac syntrophin isoforms: species-dependent expression, association with dystrophin complex and subcellular localization. *Mol Cell Biochem.* 2005;**268**:59-66.
- Jalife J, Berenfeld O, Skanes A, Mandapati R. Mechanisms of atrial fibrillation: Mother rotors or multiple daughter wavelets, or both? *J Cardiovasc Electrophysiol* 1998;**9**:S2-S12
- Jalife J, Berenfeld O, Mansour M. Mother rotors and fibrillatory conduction: a mechanism of atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2002;**54**:204-216.
- Jalife J. Rotors and spiral waves in atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2003;**14**:776-780).
- Jalife J, Berenfeld O. Molecular mechanisms and global dynamics of fibrillation: an integrative approach to the underlying basis of vortex-like reentry. *J Theor Biol* 2004;**230**:475-487.
- Jalife J, Pandit SV. Ionic mechanisms of wavebreak in fibrillation. *Heart Rhythm* 2005;**2**:660-663.
- Jalife J. Déjà vu in the theories of atrial fibrillation dynamics. *Cardiovasc Res* 2011; **89**:766-75.
- Jan LY, Barbel S, Timpe L, Laffer C, Salkoff L, O'Farrell P, Jan YN. Mutating a gene for a potassium channel by hybrid dysgenesis: an approach to the cloning of the *Shaker* locus in *Drosophila*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1983;**48**:233-245.
- Jespersen T, Grunnet M, Olesen SP. The KCNQ1 potassium channel: from gene to physiological function. *Physiology* 2005;**20**:408-416.
- Ji S, John SA, Lu Y, Weiss JN. Mechanosensitivity of the cardiac muscarinic potassium channel. A novel property conferred by Kir3.4 subunit. *J Biol Chem* 1998;**273**:1324-1328.
- Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* 2002a;**417**:515-522.
- Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. The open pore conformation of potassium channels. *Nature* 2002b;**417**:523-526.
- John SA, Xie LH, Weiss JN. Mechanism of inward rectification in Kir channels. *J Gen Physiol* 2004;**123**:623-625.
- Jones DT. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J. Mol. Biol.* 1999;**292**:195-202.
- Jones E, Roti Roti EC, Wang J, Delfosse SA, Robertson GA. Cardiac *I<sub>Kr</sub>* channels minimally comprise hERG 1a and 1b subunits. *J Biol Chem* 2004;**279**:44690-44694.
- Josephson IR, Sánchez-Chapula J, Brown AM. Early outward current in rat single ventricular cells. *Circ Res* 1984;**54**:157-162.
- Jurkiewicz NK, Sanguinetti MC. Rate-dependent prolongation of cardiac action potentials by a metanosulfonanilide class III antiarrhythmic agent. Specific block of rapidly activating delayed rectifier K<sup>+</sup> current by dofetilide. *Circ Res* 1993;**72**:75-83.
- Kääb S, Dixon J, Duc J, Ashen D, Näbauer M, Beuckelmann DJ, Steinbeck G, McKinnon D, Tomaselli GF. Molecular basis of transient outward potassium current downregulation in human heart failure: a decrease in Kv4.3 mRNA correlates with a reduction in current density. *Circulation* 1998;**98**:1383-1393.
- Kachinsky AM, Froehner SC, Milgram SL. A PDZ-containing scaffold related to the dystrophin complex at the basolateral membrane of epithelial cells. *J Cell Biol.* 1999;**145**:391-402.
- Kalifa J, Jalife J, Zaitsev AV, Bagwe S, Warren M, Moreno J, Berenfeld O, Nattel S. Intra-atrial pressure increases rate and organization of waves emanating from the superior pulmonary veins during atrial fibrillation. *Circulation* 2003;**108**:668-671.
- Kalifa J, Tanaka K, Zaitsev AV, Warren M, Vaidyanathan R, Auerbach D, Pandit S, Vikstrom KL, Ploutz-Snyder R, Talkachou A, Ateienza F, Guiraudon G, Jalife J, Berenfeld O. Mechanisms of wave fractionation at boundaries of high-frequency excitation in the posterior left atrium of the isolated sheep heart during atrial fibrillation. *Circulation* 2006;**113**:626-633.
- Kalyoncu S, Keskin O, Gursoy A. Interaction prediction and classification of PDZ domains. *BMC Bioinformatics.* 2010;**11**:357.

- Kang MG, Campbell KP.  $\gamma$  subunit of voltage-activated calcium channels. *J Biol Chem* 2003;**278**:21315-21318.
- Karthikeyan S, Leung T, Ladas JA. Structural basis of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger regulatory factor PDZ1 interaction with the carboxyl-terminal region of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem*. 2001;**276**:19683-19686.
- Kass RS, Sanguinetti MC. Inactivation of calcium channel current in the calf cardiac Purkinje fiber. Evidence for voltage- and calcium-mediated mechanisms. *J Gen Physiol* 1984;**84**:705-726.
- Kattygnarath D, Maugendre S, Neyroud N, Balse E, Ichai C, Denjoy I, Dilanian G, Martins RP, Fressart V, Berthet M, Schott JJ, Leenhardt A, Probst V, Le Marec H, Hainque B, Coulonge A, Hatem SN, Guicheney P. MOG1: a new susceptibility gene for Brugada syndrome. *Circ Cardiovasc Genet*. 2011;**4**(3):261-8.
- Katz B. Les constantes electriques de la membrane du muscle. *Arch Sci Physiol* 1949;**2**:285-299.
- Keller DI, Rougier JS, Kucera JP, Benammar N, Fressart V, Guicheney P, Madle A, Fromer M, Schläpfer J, Abriel H. Brugada syndrome and fever: genetic and molecular characterization of patients carrying SCN5A mutations. *Cardiovasc Res*. 2005;**67**:510-9.
- Kennedy MB. Origin of PDZ (DHR, GLGF) domains. *Trends Biochem Sci*. 1995;**20**:350.
- Kennedy ME, Nemej J, Clapham DE. Localization and interaction of epitope-tagged GIRK1 and CIR inward rectifier  $\text{K}^+$  channel subunits. *Neuropharmacol* 1996;**35**:831-839.
- Kenyon JL, Gibbons WR. 4-Aminopyridine and the early outward current of sheep cardiac Purkinje fibers. *J Gen Physiol* 1979;**73**:139-157.
- Keren G, Etzion T, Sherez J, Zelcer AA, Megidish R, Miller HI, Laniado S. Atrial fibrillation and atrial enlargement in patients with mitral stenosis. *Am Heart J*. 1987;**114**:1146-55.
- Kim YH, Xie F, Yashima M, Wu TJ, Valderrábano M, Lee MH, Ohara T, Voroshilovsky O, Doshi RN, Fishbein MC, Qu Z, Garfinkel A, Weiss JN, Karagueuzian HS, Chen PS. Role of papillary muscle in the generation and maintenance of reentry during ventricular tachycardia and fibrillation in isolated swine right ventricle. *Circulation* 1999;**100**:1450-9.
- Kim J, Ghosh S, Nunziato DA, Pitt GS. Identification of the components controlling inactivation of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Neuron* 2004a;**41**:745-754.
- Kim LA, Furst J, Butler MH, Xu S, Grigorieff N, Goldstein SA.  $I_{\text{to}}$  channels are octomeric complexes with four subunits of each Kv4.2 and  $\text{K}^+$  channel-interacting protein 2. *J Biol Chem* 2004b;**279**:5549-5554.
- Kin Y, Misumi Y, Ikehara Y. Biosynthesis and characterization of the brain-specific membrane protein DPPX, a dipeptidyl peptidase IV-related protein. *J Biochem* 2001;**129**:289-295.
- Kirshenbaum LA, MacLellan WR, Mazur W, French BA, Schneider MD. Highly efficient gene transfer into adult ventricular myocytes by recombinant adenovirus. *J Clin Invest*. 1993;**92**:381-7.
- Kleiman RB, Houser SR. Outward currents in normal and hypertrophied feline ventricular myocytes. *Am J Physiol* 1989;**256**:H1450-H1461.
- Kline R, Morad M. Potassium efflux and accumulation in heart muscle. Evidence from  $\text{K}^+$  electrode experiments. *Biophys J* 1976;**16**:367-372.
- Kline RP, Cohen I, Falk R, Kupersmith J. Activity-dependent extracellular  $\text{K}^+$  fluctuations in canine Purkinje fibres. *Nature* 1980;**286**:68-71.
- Klockner U, Mikala G, Schwartz A, Varadi G. Molecular studies of the asymmetric pore structure of the human cardiac voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channel. Conserved residue, Glu-1086, regulates proton-dependent ion permeation. *J Biol Chem* 1996;**271**:22293-22296.
- Kneller J, Kalifa J, Zou R, Zaitsev AV, Warren M, Berenfeld O, Vigmond EJ, Leon LJ, Nattel S, Jalife J. Mechanisms of atrial fibrillation termination by pure sodium channel blockade in an ionically-realistic mathematical model. *Circ Res*. 2005;**96**:e35-47.
- Koch SE, Bodi I, Schwartz A, Varadi G. Architecture of  $\text{Ca}^{2+}$  channel pore-lining segments revealed by covalent modification of substituted cysteines. *J Biol Chem* 2000;**275**:34493-34500.
- Komukai K, Brette F, Pascarel C, Orchard CH. Electrophysiological response of rat ventricular myocytes to acidosis. *Am J Physiol* 2002a;**283**:H412-H422.
- Komukai K, Brette F, Orchard CH. Electrophysiological response of rat atrial myocytes to acidosis. *Am J Physiol* 2002b;**283**:H715-H724.
- Kong W, Po S, Yamagishi T, Ashen MD, Stetten G, Tomaselli GF. Isolation and characterization of the human gene encoding  $I_{\text{to}}$ : further diversity by alternative mRNA splicing. *Am J Physiol* 1998;**275**:H1963-H1970.

## Bibliografia

- Koumi S, Arentzen CE, Backer CL, Wasserstrom JA. Alterations in muscarinic K<sup>+</sup> channel response to acetylcholine and to G protein-mediated activation in atrial myocytes isolated from failing human hearts. *Circulation* 1994;**90**:2213-2224.
- Koumi S, Backer CL, Arentzen CE. Characterization of inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel in human cardiac myocytes. Alterations in channel behavior in myocytes isolated from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1995a;**92**:164-174.
- Koumi S, Wasserstrom JA, Ten Eick RE.  $\beta$ -Adrenergic and cholinergic modulation of inward rectifier K<sup>+</sup> channel function and phosphorylation in guinea-pig ventricle. *J Physiol* 1995b;**486**:661-678.
- Kourliouros A, Savelieva I, Kiotsekoglou A, Jahangiri M, Camm J. Current concepts in the pathogenesis of atrial fibrillation. *Am Heart J* 2009; **157**:243-52.
- Krapivinsky G, Gordon EA, Wickman K, Velimirovic B, Krapivinsky L, Clapham DE. The G-protein-gated atrial K<sub>1</sub> channel  $I_{K_{ACh}}$  is a heteromultimer of two inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel protein. *Nature* 1995;**374**:135-141.
- Krinsky V. Spread of excitation in an inhomogeneous medium (state similar to cardiac fibrillation). *Biophysics* 1966; **11**:676-683.
- Kubo Y, Baldwin TJ, Jan YN, Jan LY. Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature* 1993a;**362**:127-133.
- Kubo Y, Reuveny E, Slesinger PA, Jan YN, Jan LY. Primary structure and functional expression of a rat G-protein-coupled muscarinic potassium channel. *Nature* 1993b;**364**:802-806.
- Kubo Y, Adelman JP, Clapham DE, Jan LY, Karschin A, Kurachi Y, Lazdunski M, Nichols CG, Seino S, Vandenberg CA. International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. *Pharmacol Rev* 2005;**57**:509-526.
- Kuo HC, Cheng CF, Clark RB, Lin JJ, Lin JL, Hoshijima M, Nguyen-Tran VT, Gu Y, Ikeda Y, Chu PH, Ross J, Giles WR, Chien KR. A defect in the Kv channel-interacting protein 2 (KChIP2) gene leads to a complete loss of  $I_{to}$  and confers susceptibility to ventricular tachycardia. *Cell* 2001;**107**:801-813.
- Kuo A, Gulbis JM, Antcliff JF, Rahman T, Lowe ED, Zimer J, Curhbertson J, Ascroft FM, Ezaki T, Doyle DA. Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state. *Science* 2003;**300**:1922-1926.
- Kuo A, Domene C, Johnson LN, Doyle DA, Venien-Bryan C. Two different conformational states of the KirBac3.1 potassium channel revealed by electron crystallography. *Structure* 2005;**13**:1463-1472.
- Kurachi Y, Nakajima T, Sugimoto T. Short-term desensitization of muscarinic K<sup>+</sup> channel current in isolated atrial myocytes and possible role of GTP-binding proteins. *Pflügers Arch* 1987; **410**:227-233.
- Kurata HT, Fedida D. A structural interpretation of voltage-gated potassium channel inactivation. *Prog Biophys Mol Biol* 2006;**92**:185-208.
- Kurata HT, Cheng WW, Arrabit C, Slesinger PA, Nichols CG. The role of the cytoplasmic pore in inward rectification of Kir2.1 channels. *J Gen Physiol* 2007;**130**:145-155.
- Kurokawa J, Abriel H, Kass RS. Molecular basis of the delayed rectifier current  $I_{Ks}$  in heart. *J Mol Cell Cardiol* 2001;**33**:873-882.
- Kuryshv YA, Gudz TI, Brown AM, Wible BA. KChAP as a chaperone for specific K<sup>+</sup> channels. *Am J Physiol* 2000;**278**:C931-C941.
- Kyndt F, Probst V, Potet F, Demolombe S, Chevallier JC, Baro I, Moisan JP, Boisseau P, Schott JJ, Escande D, Marec H. Novel *SCN5A* mutation leading either to isolated cardiac conduction defect or Brugada syndrome in a large French family. *Circulation*. 2001;**104**:3081-3086.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;**227**:680-5.
- Lal A, Haynes SR, Gorospe M. Clean western blot signals from immunoprecipitated samples. *Molecular and cellular probes*. 2005;**19**:385-388.
- Lalik PH, Krafft DS, Volberg WA, Ciccarelli RB. Characterization of endogenous sodium channel gene expressed in Chinese hamster ovary cells. *Am J Physiol* 1993;**264**:C803-C809.
- Lang SE, Westfall MV. Gene transfer into cardiac myocytes. *Methods Mol Biol*. 2015;**1299**:177-90.
- Lau AG, Hall RA. Oligomerization of NHERF-1 and NHERF-2 PDZ domains: differential regulation by association with receptor carboxyl-termini and by phosphorylation. *Biochemistry*. 2001;**40**:8572-80.
- Lazar S, Dixit S, Marchlinski FE, Callans DJ, Gerstenfeld EP. Presence of left-to-right atrial frequency gradient in paroxysmal but not persistent atrial fibrillation in humans. *Circulation* 2004; **110**:3181-6

- Lee KS, Marbán E, Tsien RW. Inactivation of calcium channels in mammalian heart cells: joint dependence on membrane potential and intracellular calcium. *J Physiol* 1985;**364**:395-411.
- Lee JK, John SA, Weiss JN. Novel gating mechanism of polyamine block in the strong inward rectifier K channel Kir2.1. *J Gen Physiol* 1999;**113**:555-564.
- Lee HJ, Zheng JJ. PDZ domains and their binding partners: structure, specificity, and modification. *Cell Commun Signal*. 2010;**8**:8.
- Leenhardt A, Lucet V, Denjoy I, Grau F, Ngoc DD, Coumel P. Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in children. A 7-year follow-up of 21 patients. *Circulation* 1995;**91**:1512-1519.
- Lehmann-Horn F, Jurkat-Rott K. Voltage-gated ion channels and hereditary disease. *Physiol Rev*. 1999;**79**:1317-72.
- Lei M, Huang CL, Zhang Y. Genetic Na<sup>+</sup> channelopathies and sinus node dysfunction. *Prog Biophys Mol Biol*. 2008;**98**:171-8.
- Lenfant N, Polanowska J, Bamps S, Omi S, Borg JP, Reboul J. A genome-wide study of PDZ-domain interactions in *C. elegans* reveals a high frequency of non-canonical binding. *BMC Genomics*. 2010;**11**:671.
- Leonoudakis D, Mailliard W, Wingerd K, Clegg D, Vandenberg C. Inward rectifier potassium channel Kir2.2 is associated with synapse-associated protein SAP97. *J Cell Sci* 2001;**114**:987-998.
- Leonoudakis D, Conti LR, Anderson S, Radeke CM, McGuire LMM, Adams ME, Froehner SC, Yates JR 3<sup>rd</sup>, Vandenberg CA. Protein trafficking and anchoring complexes revealed by proteomic analysis of inward rectifier potassium channel (Kir2.x)-associated proteins. *J Biol Chem* 2004a;**279**:22331-22346.
- Leonoudakis D, Conti LR, Radeke CM, McGuire LM, Vandenberg CA. A multiprotein trafficking complex composed of SAP97, CASK, Veli, and Mint1 is associated with inward rectifier Kir2 potassium channels. *J Biol Chem*. 2004b;**279**:19051-63.
- Lewis T. The excitation wave in the heart. En: Lewis T. Lectures on the heart. New York. Ed: *PB Hoeber*. 1915. pp: 3-31.
- Li GR, Feng J, Yue L, Carrier M, Nattel S. Evidence for two components of delayed rectifier K<sup>+</sup> current in human ventricular myocytes. *Circ Res* 1996a;**78**:689-696.
- Li GR, Feng J, Wang Z, Fermini B, Nattel S. Adrenergic modulation of ultrarapid delayed rectifier K<sup>+</sup> current in human atrial myocytes. *Circ Res* 1996b;**78**:903-915.
- Li GR, Feng J, Yue L, Carrier M. Transmural heterogeneity of action potentials and I<sub>to1</sub> in myocytes isolated from the human right ventricle. *Am J Physiol* 1998;**275**:H369-H377.
- Li D, Zhang L, Kneller J, Nattel S. Potential ionic mechanism for repolarization differences between canine right and left atrium. *Circ Res*. 2001;**88**:1168-75.
- Li J, McLerie M, Lopatin AN. Transgenic up-regulation of I<sub>K1</sub> in the mouse heart leads to multiple abnormalities of cardiac excitability. *Am J Physiol* 2004;**287**:H2790-H2802.
- Li Q, Huang H, Liu G, Lam K, et al. Gain-of-function mutation of Nav1.5 in atrial fibrillation enhances cellular excitability and lowers the threshold for action potential firing. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;**380**:132 - 137.
- Liman ER, Hess P, Weaver F, Koren G. Voltage-sensing residues in the S4 region of a mammalian K<sup>+</sup> channel. *Nature* 1991;**353**:752-756.
- Lipp P, Huser J, Pott L, Niggli E. Spatially non-uniform Ca<sup>2+</sup> signals induced by the reduction of transverse tubules in citrate-loaded guinea-pig ventricular myocytes in culture. *J Physiol* 1996;**497**:589-597.
- Litovsky SH, Antzelevitch C. Transient outward current prominent in canine ventricular epicardium but not endocardium. *Circ Res* 1988;**62**:116-126.
- Liu GX, Derst C, Schlichthörl G, Heinen S, Seeböhm G, Brüggemann A, Kummer W, Veh RW, Daut J, Preisig-Müller R. Comparison of cloned Kir2 channels with native inward rectifier K<sup>+</sup> channels from guinea-pig cardiomyocytes. *J Physiol* 2001;**532**:115-126.
- Liu CJ, Dib-Hajj SD, Renganathan M, Cummins TR, Waxman SG. Modulation of the cardiac sodium channel Nav1.5 by fibroblast growth factor homologous factor 1B. *J Biol Chem*. 2003;**278**:1029-36.
- Liu Y, Henry GD, Hegde RS, Baleja JD. Solution structure of the hDlg/SAP97 PDZ2 domain and its mechanism of interaction with HPV-18 papillomavirus E6 protein. *Biochemistry*. 2007;**46**:10864-74.
- Loewi O. Über Humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. *Pflügers Arch* 1921;**189**:239-242.
- Loewi O, Navaratil E. Übertragbarkeit der Herznevenwirkung, X. Mitteilung. Über das Schicksal des Vagusstoffes. *Pflügers Arch* 1926;**214**:678-688.

## Bibliografia

- Logothetis DE, Jin T, Lupyán D, Rosenhouse-Dantsker A. Phosphoinositide-mediated gating of inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels. *Pflügers Arch* 2007;**455**:83-95.
- Lomax AE, Kondo CS, Giles WR. Comparison of time- and voltage-dependent K<sup>+</sup> currents in myocytes from left and right atria of adult mice. *Am J Physiol* 2003;**285**:H1837-H1848.
- London B, Trudeau MC, Newton KP, Beyer AK, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Satler CA, Roberson GA. Two isoforms of the mouse ether-a-go-go-related gene coassemble to form channels with properties similar to the rapidly activating component of the cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> current. *Circ Res* 1997;**81**:870-878.
- London B, Michalec M, Mehdi H, Zhu X, Kerchner L, Sanyal S, Viswanathan PC, Pfahnl AE, Shang LL, Madhusudanan M, Baty CJ, Lagana S, Aleong R, Gutmann R, Ackerman MJ, McNamara DM, Weiss R, Dudley SC Jr. Mutation in glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 like gene (GPD1-L) decreases cardiac Na<sup>+</sup> current and causes inherited arrhythmias. *Circulation* 2007;**116**:2260-2268.
- London TB, Lee HJ, Shao Y, Zheng J. Interaction between the internal motif KTXXXI of Idax and mDvl PDZ domain. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;**322**:326-32.
- Lopatin AN, Makhina EN, Nichols CG. Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature* 1994;**372**:366-369.
- Lopatin AN, Makhina EN, Nichols CG. The mechanism of inward rectification of potassium channels: "long-pore plugging" by cytoplasmic polyamines. *J Gen Physiol* 1995;**106**:923-955.
- Lopatin AN, Shantz LM, Mackintosh CA, Nichols CG, Pegg AE. Modulation of potassium channels in the hearts of transgenic and mutant mice with altered polyamine biosynthesis. *J Mol Cell Cardiol* 2000;**32**:2007-2024.
- Lopatin AN, Nichols CG. Inward rectifiers in the heart: an update on I<sub>K1</sub>. *J Mol Cell Cardiol* 2001;**33**:625-638.
- Lopes CM, Zhang H, Rohacs T, Jin T, Yang J, Logothetis DE. Alterations in conserved Kir channel-PIP<sub>2</sub> interactions underlie channelopathies. *Neuron* 2002;**34**:933-944.
- Lopes CM, Remon JI, Matavel A, Sui JL, Keselman I, Medei E, Shen Y, Rosenhouse-Dantsker A, Rohacs T, Logothetis DE. Protein kinase A modulates PLC-dependent regulation and PIP<sub>2</sub>-sensitivity of K<sup>+</sup> channels. *Channels* 2007;**1**:124-134.
- Lou JY, Laezza F, Gerber BR, Xiao M, Yamada KA, Hartmann H, Craig AM, Nerbonne JM, Ormitz DM. Fibroblast growth factor 14 is an intracellular modulator of voltage-gated sodium channels. *J Physiol*. 2005;**569**:179-93.
- Louch WE, Sheehan KA, Wolska BM. Methods in cardiomyocyte isolation, culture, and gene transfer. *J Mol Cell Cardiol*. 2011;**51**:288-98.
- Lu Z, MacKinnon R. Electrostatic tuning of Mg<sup>2+</sup> affinity in an inward-rectifier K<sup>+</sup> channel. *Nature* 1994;**371**:243-246.
- Lu T, Zhu YG, Yang J. Cytoplasmic amino and carboxyl domains form a wide intracellular vestibule in an inwardly rectifying potassium channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;**96**:9926-9931.
- Lu T, Ting AY, Mainland J, Jan LY, Schultz PG, Yang J. Probing ion permeation and gating in a K<sup>+</sup> channel with backbone mutations in the selectivity filter. *Nat Neurosci* 2001;**4**:239-246.
- Lubitz SA, Benjamin EJ, Ellinor PT. Atrial fibrillation in congestive heart failure. *Heart Fail Clin* 2010;**6**:187-200.
- Lue WM, Boyden PA. Abnormal electrical properties of myocytes from chronically infarcted canine heart. *Circulation* 1992;**85**:1175-1188.
- Lundby A, Olesen SP. KCNE3 is an inhibitory subunit of the Kv4.3 potassium channel. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;**346**:958-967.
- MA D, Zerangue N, Lin YF, Collins A, Yu M, Jan YN, Jan LY. Role of ER export signals in controlling surface potassium channel numbers. *Science* 2001;**291**:316-9.
- Ma D, Taneja TK, Hagen BM, Kim BY, Ortega B, Lederer WJ, Welling PA. Golgi export of the Kir2.1 channel is driven by a trafficking signal located within its tertiary structure. *Cell*. 2011;**145**:1102-15.
- MacKinnon R, Yellen G. Mutations affecting TEA blockade and ion permeation in voltage-activated K<sup>+</sup> channels. *Science* 1990;**250**:276-279.
- MacKINNON R. Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* 1991;**350**:232-235.
- Makhina EN, Kelly AJ, Lopatin AN, Mercer RW, Nichols CG. Cloning and expression of a novel human brain inward rectifier potassium channel. *J Biol Chem* 1994;**269**:20468-20474.
- Makielski JC, Limberis JT, Chang SY, Fan Z, Kyle JW. Coexpression of β1 with cardiac sodium channel α

- subunits in oocytes decreases lidocaine block. *Mol Pharmacol* 1996;**49**:30-39.
- Makielski JC, Farley A. Na<sup>+</sup> current in human ventricle: implications for sodium loading and homeostasis. *Journal Of Cardiovascular Electrophysiology* 2006;**17**:15-20.
- Makielski JC. Late sodium current: a mechanism for angina, heart failure, and arrhythmia. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2009;**54**:279-286.
- Makita N, Bennett PB, George AL Jr. Molecular determinants of  $\beta 1$  subunit-induced gating modulation in voltage-dependent Na<sup>+</sup> channels. *J Neurosci* 1996;**16**:7117-7127.
- Malhotra JD, Kazen-Gillespie K, Hortsch M, Isom LL. Sodium channel beta subunits mediate homophilic cell adhesion and recruit ankyrin to points of cell-cell contact. *J Biol Chem*. 2000;**275**:11383-8.
- Mandapati R, Asano Y, Baxter WT, Gray R, Davidenko J, Jalife J. Quantification of effects of global ischemia on dynamics of ventricular fibrillation in isolated rabbit heart. *Circulation* 1998;**98**:1688-96.
- Mandapati R, Skanes A, Chen J, Berenfeld O, Jalife J. Stable microreentrant sources as a mechanism of atrial fibrillation in the isolated sheep heart. *Circulation* 2000;**101**:194-199.
- Mansour M, Mandapati R, Berenfeld O, Chen J, Samie FH, Jalife J. Left-to-right gradient of atrial frequencies during acute atrial fibrillation in the isolated sheep heart. *Circulation* 2001;**103**:2631-2636.
- Mantegazza M, Yu FH, Catterall WA, Scheuer T. Role of the C-terminal domain in inactivation of brain and cardiac sodium channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;**98**:15348-15353.
- Marian AJ, Yu QT, Mann DL, Graham FL, Roberts R. Expression of a mutation causing hypertrophic cardiomyopathy disrupts sarcomere assembly in adult feline cardiac myocytes. *Circ Res*. 1995;**77**:98-106.
- Mark MD, Herlitz S. G-protein mediated gating of inward-rectifier K<sup>+</sup> channels. *Eur J Biochem* 2000;**267**:5830-5836.
- Martens JR, Kwak YG, Tamkun MM. Modulation of Kv channel  $\alpha/\beta$  subunit interactions. *Trends Cardiovasc Med* 1999;**9**:253-258.
- Martin RL, Koumi S, Ten Eick RE. Comparison of the effects of internal [Mg<sup>2+</sup>] on I<sub>K1</sub> in cat and guinea-pig cardiac ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1995;**27**:673-691.
- Martins RP, Kaur K, Hwang E, Ramirez RJ, Willis BC, Filgueiras-Rama D, Ennis SR, Takemoto Y, Ponce-Balbuena D, Zarzoso M, O'Connell RP, Musa H, Guerrero-Serna G, Avula UM, Swartz MF, Bhushal S, Deo M, Pandit SV, Berenfeld O, Jalife J. Dominant frequency increase rate predicts transition from paroxysmal to long-term persistent atrial fibrillation. *Circulation*. 2014;**129**:1472-82.
- Mascher D, Peper K. Two components of inward current in myocardial muscle fibers. *Pflügers Arch* 1969;**307**:190-203.
- Maughan DW. Potassium movement during hyperpolarization of cardiac muscle. *J Memb Biol* 1976;**28**:241-262.
- Mathur R, Choi WS, Eldstrom J, Wang Z, Kim J, Steele DF, Fedida D. . A specific N-terminal residue in Kv1.5 is required for upregulation of the channel by SAP97. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;**342**:1-8
- Matsuda H, Saigusa A, Irisawa H. Ohmic conductance through the inwardly rectifying K channel and blocking by internal Mg<sup>2+</sup>. *Nature* 1987;**325**:156-159.
- Matsuda H. Open-state substructure of inwardly rectifying potassium channels revealed by magnesium block in guinea-pig heart cells. *J Physiol* 1988;**397**:237-258.
- Matsuda H, Cruz JdS. Voltage-dependent block by internal Ca<sup>2+</sup> ions of inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels in guinea-pig ventricular cells. *J Physiol* 1993;**470**:295-311.
- Mazzanti A, Maragna R, Faragli A, Monteforte N, Bloise R, Memmi M, Novelli V, Baiardi P, Bagnardi V, Etheridge SP, Napolitano C, Priori SG. Gene-Specific Therapy With Mexiletine Reduces Arrhythmic Events in Patients With Long QT Syndrome Type 3. *J Am Coll Cardiol*. 2016;**67**:1053-8.
- McAllister RE, Noble D. The time and voltage dependence of the slow outward current in cardiac Purkinje fibres. *J Physiol* 1966;**186**:632-662.
- McCormick KA, Isom LL, Ragsdale D, Scheuer T, Catterall WA. Molecular determinants of Na<sup>+</sup> channel function in the extracellular domain of the  $\beta 1$  subunit. *J Biol Chem* 1998;**273**:3954-3962.
- McCormick KA, Srinivasan J, White K, Scheuer T, Catterall WA. The extracellular domain of the  $\beta 1$  subunit is both necessary and sufficient for  $\beta 1$ -like modulation of sodium channel gating. *J Biol Chem* 1999;**274**:32638-32646.
- McCrossan ZA, Abbott GW. The MinK-related peptides. *Neuropharmacology* 2004;**47**:787-821.

## Bibliografía

- McIntosh MA, Cobbe SM, Kane KA, Rankin AC. Action potential prolongation and potassium currents in left ventricular myocytes isolated from hypertrophied rabbit hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1998;**30**:43-53.
- McLerie M, Lopatin A. Dominant-negative suppression of  $I_{K1}$  in the mouse heart leads to altered cardiac excitability. *J Mol Cell Cardiol* 2003;**35**:367-378.
- McNair WP, Ku L, Taylor MR, Fain PR, Dao D, Wolfel E, Mestroni L; Familial Cardiomyopathy Registry Research Group. SCN5A mutation associated with dilated cardiomyopathy, conduction disorder, and arrhythmia. *Circulation*. 2004 12;**110**:2163-7.
- McNair WP, Sinagra G, Taylor MR, Di Lenarda A, Ferguson DA, Salcedo EE, Slavov D, Zhu X, Caldwell JH, Mestroni L; Familial Cardiomyopathy Registry Research Group. SCN5A mutations associate with arrhythmic dilated cardiomyopathy and commonly localize to the voltage-sensing mechanism. *J Am Coll Cardiol*. 2011;**57**:2160-8.
- Medeiros-Domingo A, Kaku T, Tester DJ, Iturralde-Torres P, Itty A, Ye B, Valdivia C, Ueda K, Canizales-Quinteros S, Tusié-Luna MT, Makielski JC, Ackerman MJ. SCN4A-encoded sodium channel  $\beta_4$  subunit in congenital long-QT syndrome. *Circulation* 2007;**60**:739-752.
- Melnyk P, Zhang L, Shrier A, Nattel S. Differential distribution of Kir2.1 and Kir2.3 subunits in canine atrium and ventricle. *Am J Physiol* 2002;**283**:H1123-H1133.
- Mercier A, Clément R, Harnois T, Bourmeyster N, Faivre JF, Findlay I, Chahine M, Bois P, Chatelier A. The  $\beta_1$ -subunit of Na(v)1.5 cardiac sodium channel is required for a dominant negative effect through  $\alpha$ - $\alpha$  interaction. *PLoS One*. 2012;**7**:e48690.
- Mercier A, Clément R, Harnois T, Bourmeyster N, Bois P, Chatelier A. Nav1.5 channels can reach the plasma membrane through distinct N-glycosylation states. *Biochim Biophys Acta*. 2015;**1850**:1215-23.
- Michael G, Xiao L, Qi XY, Dobrev D, Nattel S. Remodelling of cardiac repolarization: how homeostatic responses can lead to arrhythmogenesis. *Cardiovasc Res* 2009;**81**:491-9
- Mikala G, Bahinski A, Yatani A, Tang S, Schwartz A. Differential contribution by conserved glutamate residues to an ion-selectivity site in the L-type  $Ca^{2+}$  channel pore. *FEBS Lett* 1993;**335**:265-269.
- Mikala G, Klockner U, Varadi M, Eisfeld J, Schwartz A, Varadi G. cAMP-dependent phosphorylation sites and macroscopic activity of recombinant cardiac L-type calcium channels. *Mol Cell Biochem* 1998;**185**:95-109.
- Milstein ML, Musa H, Balbuena DP, Anumonwo JM, Auerbach DS, Furspan PB, Hou L, Hu B, Schumacher SM, Vaidyanathan R, Martens JR, Jalife J. Dynamic reciprocity of sodium and potassium channel expression in a macromolecular complex controls cardiac excitability and arrhythmia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;**109**:E2134-43.
- Mines G. On circulating excitations in heart muscles and their possible relation to tachycardia and fibrillation. *Trans R. Soc. Can.* 1914;**4**:43-52.
- Mitarai S, Reed TD, Yatani A. Changes in ionic currents and  $\beta$ -adrenergic receptor signaling in hypertrophied myocytes overexpressing  $G\alpha_q$ . *Am J Physiol* 2000;**279**:H139-H148.
- Mitcheson JS, Hancox JC, Levi AJ. Action potentials, ion channel currents and transverse tubule density in adult rabbit ventricular myocytes maintained for 6 days in cell culture. *Pflügers Arch* 1996;**431**:814-827.
- Mitcheson JS, Sanguinetti MC. Biophysical properties and molecular basis of cardiac rapid and slow delayed rectifier potassium channels. *Cell Physiol Biochem* 1999;**9**:201-216.
- Mitra R, Morad M. Two types of calcium channels in guinea pig ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;**83**:5340-5344.
- Moe GK Atrial fibrillation a self sustained arrhythmia independent of focal discharge *AM Hear J* 1959;**58**:59-70.
- Moe GK, Rheinboldt WC, Abildskov JA. A computer model of atrial fibrillation. *Am Heart J* 1964; **67**:200-220.
- Mohanty S, Ovee M, Banerjee M. PDZ Domain Recognition: Insight from Human Tax-Interacting Protein 1 (TIP-1) Interaction with Target Proteins. *Biology (Basel)*. 2015;**4**:88-103.
- Mohler PJ, Abriel H. Complexity of cardiac ion channel macromolecular complexes. *Cardiovasc Res*. 2016;**110**:163-4.
- Mohler PJ, Schott JJ, Gramolini AO, Dilly KW, Guatimosim S, duBell WH, Song LS, Haurogné K, Kyndt F, Ali ME, Rogers TB, Lederer WJ, Escande D, Le Marec H, Bennett V. Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature* 2003;**421**:634-639.
- Mohler PJ, Rivolta I, Napolitano C, LeMaillet G, Lambert S, Priori SG, Bennett V. Nav1.5 E1053K mutation causing Brugada syndrome blocks binding to ankyrin-G and expression of Nav1.5 on the surface of

- cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;**101**:17533-8.
- Morais-Cabral JH, Zhou Y, MacKinnon R. Energetic optimization of ion conduction rate by the K<sup>+</sup> selectivity filter. *Nature* 2001;**414**:37-42.
- Morales MJ, Castellino RC, Crews AL, Rasmusson RL, Strauss HC. A novel  $\beta$  subunit increases rate of inactivation of specific voltage-gated potassium channel  $\alpha$  subunits. *J Biol Chem* 1995;**270**:6272-6277.
- Moreau C, Jacquet H, Prost AL, D'ahan N, Vivaudou M. The molecular basis of the specificity of action of K<sub>ATP</sub> channel openers. *EMBO J* 2000;**19**:6644-6651.
- Moreau C, Prost AL, Derand R, Vivaudou M. SUR, ABC proteins targeted by K<sub>ATP</sub> channel openers. *J Mol Cell Cardiol* 2005;**38**:951-963.
- Morgan K, Stevens EB, Shah B, Cox PJ, Dixon AK, Lee K, Pinnock RD, Hughes J, Richardson PJ, Mizuguchi K, Jackson AP.  $\beta 3$ : An additional auxiliary subunit of the voltage-sensitive sodium channel that modulates channel gating with distinct kinetics. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;**97**:2308-2313.
- Mori Y, Mikala G, Varadi G, Kobayashi T, Koch S, Wakamori M, Schwartz A. Molecular pharmacology of voltage-dependent calcium channels. *Jpn J Pharmacol* 1996;**72**:83-109.
- Moric E, Herbert E, Trusz-Gluza M, Filipecki A, Mazurek U, Wilczok T. The implications of genetic mutations in the sodium channel gene (SCN5A). *Europace* 2003;**5**:325-34.
- Morillo CA, Klein GJ, Jones DL, Guiraudon CM. Chronic rapid atrial pacing: structural, functional, and electrophysiological characteristics of new model of sustained atrial fibrillation. *Circulation* 1995;**91**:1588-1595.
- Morishige K, Takahashi N, Findlay I, Koyama H, Zanelli JS, Peterson C, Jenkins NA, Copeland NG, Mori N, Kurachi Y. Molecular cloning, functional expression and localization of an inward rectifier potassium channel in the mouse brain. *FEBS Lett* 1993;**336**:375-380.
- Morishige K, Takahashi N, Jahangir A, Yamada M, Koyama H, Zanelli JS, Kurachi Y. Molecular cloning and functional expression of a novel brain-specific inward rectifier potassium channel. *FEBS Lett* 1994;**346**:251-256.
- Morrison DK. The 14-3-3 proteins: integrators of diverse signaling cues that impact cell fate and cancer development. *Trends Cell Biol*. 2009;**19**:16-23.
- Motoike HK, Liu H, Glaaser IW, Yang AS, Tateyama M, Kass RS. The Na<sup>+</sup> channel inactivation gate is a molecular complex: a novel role of the COOH-terminal domain. *J Gen Physiol* 2004;**123**:155-165.
- Mrowiec T, Schwappach B. 14-3-3 proteins in membrane protein transport. *Biol Chem*. 2006;**387**:1227-36.
- Mubagwa R, Flameng W, Carmeliet E. Resting and action potentials of non ischemic and chronically ischemic human ventricular muscle. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1994;**5**:659-671.
- Muñoz V, Vaidyanathan R, Tolkacheva EG, Dhamoon AS, Taffet SM, Anumonwo JM. Kir2.3 isoform confers pH sensitivity to heteromeric Kir2.1/Kir2.3 channels in HEK293 cells. *Heart Rhythm* 2007;**4**:487-496.
- Murai T, Kakizuka A, Takumi T, Ohkubo H, Nakanishi S. Molecular cloning and sequence analysis of human genomic DNA encoding a novel membrane protein which exhibits a slowly activating potassium channel activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;**161**:176-181.
- Muramatsu H, Sato R, Okumura H. Early increase in K<sup>+</sup> conductance during metabolic inhibition by cyanide in guinea pig ventricular myocytes. *Nippon Ika Daigaku Zasshi* 1990;**57**:308-321.
- Näbauer M, Beuckelmann DJ, Erdmann E. Characteristics of transient outward current in human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ Res* 1993;**73**:386-394.
- Näbauer M, Beuckelmann DJ, Überfuhr P, Steinbeck G. Regional differences in current density and rate-dependent properties of the transient outward current in subepicardial and subendocardial myocytes of human left ventricle. *Circulation* 1996;**93**:168-177.
- Näbauer M, Käab S. Potassium channel downregulation in heart failure. *Cardiovasc Res* 1998;**37**:324-334.
- Nadal MS, Ozaita A, Amarillo Y, Vega-Saenz de Miera E, Ma Y, Mo W, Goldberg EM, Misumi Y, Ikehara Y, Neubert TA, Rudy B. The CD26-related dipeptidyl aminopeptidase-like protein DPPX is a critical component of neuronal A-type K<sup>+</sup> channels. *Neuron* 2003;**37**:449-461.
- Nagai T, Yamada S, Tominaga T, Ichikawa M, Miyawaki A. Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca(2+) by circularly permuted yellow fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;**101**:10554-9.

## Bibliografia

- Nakahira K, Shi G, Rhodes KJ, Trimmer JS. Selective interaction of voltage-gated K<sup>+</sup> channel  $\beta$ -subunits with  $\alpha$ -subunits. *J Biol Chem* 1996;**271**:7084-7089.
- Nakamura TY, Artman M, Rudy B, Coetzee WA. Inhibition of rat ventricular I<sub>K1</sub> with antisense oligonucleotides targeted to Kir2.1 mRNA. *Am J Physiol* 1998;**274**:H892-H900.
- Nakano Y, Shimizu W. Genetics of long-QT syndrome. *J Hum Genet.* 2016;**61**:51-5.
- Napolitano C, Bloise R, Priori SG. Gene-specific therapy for inherited arrhythmogenic diseases. *Pharmacol Ther* 2006;**110**:1-13.
- Narayan SM, Krummen DE, Rappel WJ. Clinical mapping approach to diagnose electrical rotors and focal impulse sources for human atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2012; **5**:447-54.
- Nattel S, Singh BN. Evolution, mechanisms, and classification of antiarrhythmic drugs: focus on class III actions. *Am J Cardiol* 1999;**84**:11R-19R.
- Nattel S, Yue L, Wang Z. Cardiac ultrarapid delayed rectifiers. A novel potassium current family of functional similarity and molecular diversity. *Cell Physiol Biochem* 1999;**9**:217-226.
- Nattel S. New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature* 2002;**415**:219-226.
- Nattel S, Burstein B, Dobrev D. Atrial remodeling and atrial fibrillation: Mechanisms and implications. *Circ Arrhythmia Electrophysiol* 2008;**1**:62-73.
- Nattel S, Frelin Y, Gaborit N, Louault C, Demolombe S. Ion channel mRNA expression profiling: Insights into cardiac remodeling and arrhythmic substrates. *J Mol Cell Cardiol* 2010;**48**:96-105.
- Nawathe PA, Kryukova Y, Oren RV, Milanese R, Clancy CE, Lu JT, Moss AJ, DiFrancesco D, Robinson RB. An LQTS6 MiRP1 mutation suppresses pacemaker current and is associated with sinus bradycardia. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2013;**24**:1021-7.
- Neely JD, Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP, Froehner SC, Agre P, Adams ME. Syntrophin-dependent expression and localization of Aquaporin-4 water channel protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;**98**:14108-13.
- Neher E. Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments. *Methods Enzymol* 1992;**207**:123-131.
- Nehring RB, Wischmeyer E, Döring F, Veh RW, Sheng M, Karschin A. Neuronal inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels differentially couple to PDZ proteins of the PSD-95/SAP90 family. *J Neurosci* 2000;**20**:156-162.
- Nerbonne JM. Molecular basis of functional voltage-gated K<sup>+</sup> channel diversity in the mammalian myocardium. *J Physiol* 2000;**525**:285-298.
- Nerbonne JM, Kass RS. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev* 2005;**85**:1205-1253.
- Nernst W. Zur Kinetik der in Lösung befindlichen Körper: Theorie der Diffusion. *Z Phys Chem* 1888;**6**:13-637.
- Newey SE, Benson MA, Ponting CP, Davies KE, Blake DJ. Alternative splicing of dystrobrevin regulates the stoichiometry of syntrophin binding to the dystrophin protein complex. *Curr Biol.* 2000;**10**:1295-8.
- Nichols CG, Makhina EN, Pearson WL, Sha Q, Lopatin AN. Inward rectification and implications for cardiac excitability. *Circ Res* 1996;**78**:1-7.
- Nichols CG, Singh GK, Grange DK. KATP channels and cardiovascular disease: suddenly a syndrome. *Circ Res.* 2013;**112**:1059-72.
- Nilius B, Hess P, Lansman JB, Tsien RW. A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cells. *Nature* 1985;**316**:443-446.
- Nishida M, MacKinnon R. Structural basis of inward rectification. Cytoplasmic pore of the G protein-gated inward rectifier GIRK1 at 1.8 Å resolution. *Cell* 2002;**111**:957-965.
- Niwa N, Nerbonne JM. Molecular determinants of cardiac transient outward potassium current (I<sub>to</sub>) expression and regulation. *J Mol Cell Cardiol* 2010;**48**:12-25.
- Noble D. Electrical properties of cardiac muscle attributable to inward-going (anomalous) rectification. *J Cell Comp Physiol* 1965;**66**:127-136.
- Noda M, Suzuki H, Huma S, Stühmer W. A single point mutation confers tetrodotoxin and saxotoxin insensitivity on the sodium channel II. *FEBS Lett* 1989;**259**:213-216.
- Noma A, Trautwein W. Relaxation of the ACh-induced potassium current in the rabbit sinoatrial node cell. *Pflügers Arch* 1978;**377**:193-200.
- Noorman M, Hakim S, Kessler E, Groeneweg JA, Cox MG, Asimaki A, van Rijen HV, van Stuijvenberg L, Chkourko H, van der Heyden MA, Vos MA, de Jonge N, van der Smagt JJ, Dooijes D, Vink A, de Weger RA, Varro A, de Bakker JM, Saffitz JE, Hund TJ, Mohler PJ, Delmar M, Hauer RN, van Veen TA. Remodeling of

- the cardiac sodium channel, connexin43, and plakoglobin at the intercalated disk in patients with arrhythmogenic cardiomyopathy. *Heart Rhythm*. 2013; **10**:412-9.
- Noujaim SF, Auerbach DS, Jalife J. Ventricular fibrillation: dynamics and ion channel determinants. *Circ J*. 2007a; **71** Suppl A:A1-11.
- Noujaim SF, Pandit SV, Berenfeld O, Vikstrom K, Cerrone M, Mironov S, Zugermayr M, Lopatin AN, Jalife J. Up-regulation of the inward rectifier K<sup>+</sup> current ( $I_{K1}$ ) in the mouse heart accelerates and stabilizes rotors. *J Physiol* 2007b; **578**:315-326.
- Noujaim SF, Stuckey JA, Ponce-Balbuena D, Ferrer-Villada T, López-Izquierdo A, Pandit SV, Sánchez-Chapula JA, Jalife J. Structural bases for the different anti-fibrillatory effects of chloroquine and quinidine. *Cardiovasc Res*. 2011; **89**:862-9.
- Núñez L, Barana A, Amorós I, de la Fuente MG, Dolz-Gaitón P, Gómez R, Rodríguez-García I, Mosquera I, Monserrat L, Delpón E, Caballero R, Castro-Beiras A, Tamargo J. p.D1690N Nav1.5 rescues p.G1748D mutation gating defects in a compound heterozygous Brugada syndrome patient. *Heart Rhythm*. 2013; **10**:264-72.
- Nygren A, Lomax AE, Giles WR. Optical mapping system for recording action potential durations in adult mouse left and right atrium. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. 2004; **5**:3576-7.
- O'leary ME, Horn R. Internal block of human heart sodium channels by symmetrical tetra-alkylammoniums. *J Gen Physiol*. 1994; **104**:507-22.
- O'reilly, J. P., Wang, S.-Y., Kallen, R. G., & Wang, G. K. Comparison of slow inactivation in human heart and rat skeletal muscle Na<sup>+</sup> channel chimaeras. *The Journal of Physiology*. 1999; **515**(Pt 1): 61-73.
- Oliva C, Cohen IS, Pennefather P. The mechanism of rectification of  $iK1$  in canine Purkinje myocytes. *J Gen Physiol* 1990; **96**:299-318.
- Olson TM, Alekseev AE, Liu XK, Park S, Zingman LV, Bienengraeber M, Sattiraju S, Ballew JD, Jahangir A, Terzic A. Kv1.5 channelopathy due to KCNA5 loss-of-function mutation causes human atrial fibrillation. *Hum Mol Genet* 2006; **15**:2185-2191.
- Osterrieder W, Yang QF, Trautwein W. The time course of the muscarinic response to ionophoretic acetylcholine application to the S-A node of the rabbit heart. *Pflügers Arch* 1981; **389**:283-291.
- Oudit GY, Kassiri Z, Sah R, Ramirez RJ, Zobel C, Backx PH. The molecular physiology of the cardiac transient outward potassium current ( $I_{to}$ ) in normal and diseased myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2001; **33**:851-872.
- Oxford GS, YEH JZ. Interactions of monovalent cations with sodium channels in squid axon. I. Modification of physiological inactivation gating. *J Gen Physiol* 1985; **85**:583-602.
- Paasche JD, Attramadal T, Kristiansen K, Oksvold MP, Johansen HK, Huitfeldt HS, Dahl SG, Attramadal H. Subtype-specific sorting of the ETA endothelin receptor by a novel endocytic recycling signal for G protein-coupled receptors. *Mol Pharmacol*. 2005; **67**:1581-90.
- Panama BK, Lopatin AN. Differential polyamine sensitivity in inwardly rectifying Kir2 potassium channels. *J Physiol* 2006; **571**:287-302.
- Panama BK, McLerie M, Lopatin AN. Heterogeneity of  $I_{K1}$  in the mouse heart. *Am J Physiol* 2007; **293**:H3558-H3567.
- Pandit SV, Berenfeld O, Anumonwo JMB, Zaritski RM, Kneller J, Nattel S, Jalife J. Ionic Determinants of Functional Reentry in a 2-D Model of Human Atrial Cells During Simulated Chronic Atrial Fibrillation. *Biophys. J*. 2005; **88**:3806-3821.
- Pandit SV, Warren M, Mironov S, Tolkacheva EG, Kalifa J, Berenfeld O, Jalife J. Mechanisms Underlying the Antifibrillatory Action of Hyperkalemia in Guinea Pig Hearts. *Biophys. J*. 2010; **98**:2091-2101.
- Pandit SV, Zlochiver S, Filgueiras-Rama D, Mironov S, Yamazaki M, Ennis SR, Noujaim S, Workman AJ, Berenfeld O, Kalifa J, Jalife J. Targeting Atrio-Ventricular Differences in Ion Channel Properties for Terminating Acute Atrial Fibrillation in Pigs. *Cardiovasc. Res*. 2011; **89**:843-51.
- Pandit SV, Jalife J. Rotors and the dynamics of cardiac fibrillation. *Circ Res*. 2013; **112**:849-62.
- Papazian DM, Schwarz TL, Tempel BL, Jan YN, Jan LY. Cloning of genomic and complementary DNA from *Shaker*, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. *Science* 1987; **237**:749-753.
- Papazian DM, Timpe LC, Jan YN, Jan LY. Alteration of voltage-dependence of *Shaker* potassium channel by mutations in the S4 sequence. *Nature* 1991; **349**:305-310.
- Patel SP, Campbell DL, Strauss HC. Elucidating KChIP effects on Kv4.3 inactivation and recovery kinetics with a minimal KChIP2 isoform. *J Physiol* 2002; **545**:5-11.
- Oudit GY, Kassiri Z, Sah R, Ramirez RJ, Zobel C, Backx PH. The molecular physiology of the cardiac

## Bibliografía

- Patlak J, Ortiz M. Slow currents through single sodium channels of the adult rat heart. *J Gen Physiol* 1985;**86**:89-104.
- Pegan S, Arrabit C, Zhou W, Kwiatkowski W, Collins A, Slesinger PA, Choe S. Cytoplasmic domain structures of Kir2.1 and Kir3.1 show sites for modulating gating and rectification. *Nat Neurosci* 2005;**8**:279-287.
- Pegan S, Arrabit C, Slesinger PA, Choe S. Andersen's syndrome mutation effects on the structure and assembly of the cytoplasmic domains of Kir2.1. *Biochemistry* 2006;**45**:8599-8606.
- Pelleg A, Belardinelli L. Cardiac electrophysiology and pharmacology of adenosine: basic and clinical aspects. *Cardiovasc Res* 1993;**27**:54-61.
- Pérez-Hernández M, Matamoros M, Barana A, Amorós I, Gómez R, Núñez M, Sacristán S, Pinto Á, Fernández-Avilés F, Tamargo J, Delpón E, Caballero R. Pitx2c increases in atrial myocytes from chronic atrial fibrillation patients enhancing IKs and decreasing ICa,L. *Cardiovasc Res*. 2016;**109**:431-41.
- Pérez-Reyes E. Molecular physiology of low-voltage-activated T-Type calcium channels. *Physiol Rev* 2003;**83**:117-161.
- Périer R, Radecke CM, Vandenberg CA. Primary structure and characterization of a small-conductance inwardly rectifying potassium channel from human hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;**91**:6240-6244.
- Peters MF, Adams ME, Froehner SC. Differential association of syntrophin pairs with the dystrophin complex. *J Cell Biol*. 1997;**138**:81-93.
- Peterson BZ, Lee JS, Mülle JG, Wang Y, de Leon M, Yue DT. Critical determinants of Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation within an EF-hand motif of L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Biophys J* 2000;**78**:1906-1920.
- Peterson FC, Penkert RR, Volkman BF, Prehoda KE. Cdc42 regulates the Par-6 PDZ domain through an allosteric CRIB-PDZ transition. *Mol Cell*. 2004;**13**:665-76
- Petitprez S, Zmoos AF, Ogrodnik J, Balse E, Raad N, El-Haou S, Albesa M, Bittihn P, Luther S, Lehnart SE, Hatem SN, Coulombe A, Abriel H. SAP97 and dystrophin macromolecular complexes determine two pools of cardiac sodium channels Nav1.5 in cardiomyocytes. *Circ Res*. 2011;**108**:294-304.
- Piao L, Li J, McLerie M, Lopatin AN. Cardiac I<sub>K1</sub> underlies early action potential shortening during hypoxia in the mouse heart. *J Mol Cell Cardiol* 2007a;**43**:27-38.
- Piao L, Li J, McLerie M, Lopatin AN. Transgenic upregulation of I<sub>K1</sub> in the mouse heart is proarrhythmic. *Basic Res Cardiol* 2007b;**102**:416-428.
- Pinto JM, Boyden PA. Reduced inward rectifying and increased E-4031-sensitive K<sup>+</sup> current density in arrhythmogenic subendocardial Purkinje myocytes from the infarcted heart. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1998;**9**:299-311.
- Plaster NM, Tawil R, Tristani-Firouzi M, Canun S, Bendahhou S, Tsunoda A, Donaldson MR, Iannaccone ST, Brunt E, Barohn R, Clark J, Deymeer F, George AL Jr, Fish FA, Hahn A, Nitu A, Ozdemir C, Serdaroglu P, Subramony SH, Wolfe G, Fu YH, Ptacek LJ. Mutations in Kir2.1 cause the developmental and episodic electrical phenotypes of Andersen's Syndrome. *Cell* 2001;**105**:511-519.
- Poet M, Tauc M, Lingueglia E, Cance P, Poujeol P, Lazdunski M, Counillon L. Exploration of the pore structure of a peptide-gated Na<sup>+</sup> channel. *EMBO J* 2001;**20**:5595-602.
- Pogwizd SM, Schlotthauer K, Li L, Yuan W, Bers DM. Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: roles of sodium-calcium exchange, inward rectifier potassium current, and residual  $\beta$ -adrenergic responsiveness. *Circ Res* 2001;**88**:1159-1167.
- Pond AL, Scheve BK, Benedict AT, Petrecca K, Van Wagoner DR, Shrier A, Nerbonne JM. Expression of distinct ERG proteins in rat, mouse, and human heart. Relation to functional I<sub>Kr</sub> channels. *J Biol Chem* 2000;**275**:5997-6006.
- Ponting CP. Evidence for PDZ domains in bacteria, yeast, and plants. *Protein Sci*. 1997;**6**:464-8.
- Postema PG, Ritsema van Eck HJ, Opthof T, van Herpen G, van Dessel PF, Priori SG, Wolpert C, Borggrefe M, Kors JA, Wilde AA. I<sub>K1</sub> modulates the U-wave: insights in a 100-year-old enigma. *Heart Rhythm* 2009;**6**:393-400.
- Postma AV, Denjoy I, Hoorntje TM, Lupoglazoff JM, Da Costa A, Sebillon P, Mannens MM, Wilde AA, Guicheney P. Absence of calsequestrin 2 causes severe forms of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circ Res* 2002;**91**:e21-e26.
- Pourrier M, Zicha S, Ehrlich J, Han W, Nattel S. Canine ventricular KCNE2 expression resides predominantly in Purkinje fibers. *Circ Res* 2003;**93**:189-191.
- Pragnell M, De Waard M, Mori Y, Tanabe T, Snutch TP, Campbell KP. Calcium channel  $\beta$  subunit binds to a

- conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the  $\alpha 1$  subunit. *Nature* 1994;**368**:67-70.
- Preisig-Müller R, Schlichthörl G, Goerge T, Heinen S, Brüggemann A, Rajan S, Derst C, Veh RW, Daut J. Heteromerization of Kir2.x potassium channels contributes to the phenotype of Andersen's syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;**99**:7774-7779.
- Priori SG, Napolitano C, Memmi M, Colombi B, Drago F, Gasparini M, DeSimoni L, Coltorti F, Bloise R, Keegan R, Cruz Filho FE, Vignati G, Benatar A, DeLogu A. Clinical and molecular characterization of patients with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation* 2002;**106**:69-74.
- Priori SG, Pandit SV, Rivolta I, Berenfeld O, Ronchetti E, Dharmoon A, Napolitano C, Anumonwo J, di Barletta MR, Gudapakam S, Bosi G, Stramba-Badiale M, Jalife J. A novel form of short QT syndrome (SQT3) is caused by a mutation in the KCNJ2 gene. *Circ Res* 2005;**96**:800-807.
- Priori SG, Wilde AA, Horie M, Cho Y, Behr ER, Berul C, Blom N, Brugada J, Chiang CE, Huikuri H, Kannankeril P, Krahn A, Leenhardt A, Moss A, Schwartz PJ, Shimizu W, Tomaselli G, Tracy C; Document Reviewers, Ackerman M, Belhassen B, Estes NA 3rd, Fatkin D, Kalman J, Kaufman E, Kirchhof P, Schulze-Bahr E, Wolpert C, Vohra J, Refaat M, Etheridge SP, Campbell RM, Martin ET, Quek SC; Heart Rhythm Society; European Heart Rhythm Association; Asia Pacific Heart Rhythm Society. Executive summary: HRS/EHRA/APHS expert consensus statement on the diagnosis and management of patients with inherited primary arrhythmia syndromes. *Europace*. 2013;**15**:1389-406.
- Pu J, Wada T, Valdivia C, Chutkow WA, Burant CF, Makielski JC. Evidence of  $K_{ATP}$  channels in native cardiac cells without SUR. *Biophys J* 2001;**80**:863-868.
- Qu Y, Rogers J, Tanada T, Scheuer T, Catterall WA. Modulation of cardiac  $Na^+$  channels expressed in a mammalian cell line and in ventricular myocytes by protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;**91**:3289-93.
- Qu Y, Isom LL, Westenbroek RE, Rogers JC, Tanada TN, McCormick KA, Scheuer T, Catterall WA. Modulation of cardiac  $Na^+$  channel expression in *Xenopus* oocytes by beta 1 subunits. *J Biol Chem*. 1995;**270**:25696-701.
- Qu Z, Yang Z, Cui N, Zhu G, Liu C, Xu H, Chanchevalap S, Shen W, Wu J, Li Y, Jiang C. Gating of inward rectifier  $K^+$  channels by proton-mediated interactions of N- and C-terminal domains. *J Biol Chem* 2000;**275**:31573-31580.
- Raab-Graham KF, Radeke CM, Vandenberg CA. Molecular cloning and expression of a human heart inward rectifier potassium channel. *NeuroReport* 1994;**5**:2501-2505.
- Radicke S, Cotella D, Graf EM, Banse U, Jost N, Varro A, Tseng GN, Ravens U, Wettwer E. Functional modulation of the transient outward current  $I_{to}$  by KCNE  $\beta$ -subunits and regional distribution in human non-failing and failing hearts. *Cardiovasc Res* 2006;**71**:695-703.
- Radicke S, Vaquero M, Caballero R, Gómez R, Núñez L, Tamargo J, Ravens U, Wettwer E, Delpón E. Effects of MiRP1 and DPP6  $\beta$ -subunits on the blockade induced by flecainide of Kv4.3/KChIP2 channels. *Br J Pharmacol* 2008;**154**:774-786.
- Rafizadeh S, Zhang Z, Woltz RL, Kim HJ, Myers RE, Lu L, Tuteja D, Singapuri A, Bigdeli AA, Harchache SB, Knowlton AA, Yarov-Yarovoy V, Yamoah EN, Chiamvimonvat N. Functional interaction with filamin A and intracellular  $Ca^{2+}$  enhance the surface membrane expression of a small-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  (SK2) channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;**111**:9989-94.
- Reina J, Lacroix E, Hobson SD, Fernandez-Ballester G, Rybin V, Schwab MS, Serrano L, Gonzalez C. Computer-aided design of a PDZ domain to recognize new target sequences. *Nat Struct Biol*. 2002;**9**:621-7.
- Rekas A, Alattia JR, Nagai T, Miyawaki A, Ikura M. Crystal structure of venus, a yellow fluorescent protein with improved maturation and reduced environmental sensitivity. *J Biol Chem*. 2002;**277**:50573-8.
- Reuter H. Divalent cations as change carriers in excitable membranes. *Prog Biophys Mol Biol* 1973;**26**:1-43.
- Riuró H, Beltran-Alvarez P, Tarradas A, Selga E, Campuzano O, Vergés M, Pagans S, Iglesias A, Brugada J, Brugada P, Vázquez FM, Pérez GJ, Scornik FS, Brugada R. A missense mutation in the sodium channel  $\beta 2$  subunit reveals SCN2B as a new candidate gene for Brugada syndrome. *Hum Mutat*. 2013;**34**(7):961-6.
- Rivero-Gutiérrez B, Anzola A, Martínez-Augustin O, de Medina FS. Stain-free detection as loading control alternative to Ponceau and housekeeping protein immunodetection in Western blotting. *Anal Biochem* 2014;**467**:1-3.
- Roberts R. Genomics and cardiac arrhythmias. *J Am Coll Cardiol* 2006;**47**:9-21.
- Rodríguez-Menchaca AA, Navarro-Polanco RA, Ferrer-Villada T, Rupp J, Sachse FB, Tristani-Firouzi M,

## Bibliografía

- Sánchez-Chapula JA. The molecular basis of chloroquine block of the inward rectifier Kir2.1 channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;**105**:1364-1368.
- Rohacs T, Chen J, Prestwich GD, Logothetis DE. Distinct specificities of inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels for phosphoinositides. *J Biol Chem* 1999;**274**:36065-36072.
- Rohacs T, Lopes CM, Jin T, Ramdya PP, Molnar Z, Logothetis DE. Specificity of activation by phosphoinositides determines lipid regulation of Kir channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;**100**:745-750.
- Rook MB, Evers MM, Vos MA, Bierhuizen MF. Biology of cardiac sodium channel Nav1.5 expression. *Cardiovasc Res*. 2012;**93**:12-23.
- Rosati B, Pan Z, Lypen S, Wang HS, Cohen I, Dixon JE, McKinnon D. Regulation of KChIP2 potassium channel  $\beta$  subunit gene expression underlies the gradient of transient outward current in canine and human ventricle. *J Physiol* 2001;**533**:119-125.
- Rougier O, Vassort G, Stampfli R. Voltage clamp experiments on frog atrial heart muscle fibres with the sucrose gap technique. *Pflügers Arch Gesamte Physiol Menschen Tiere* 1968;**301**:91-108.
- Rougier JS, van Bemmelen MX, Bruce MC, Jespersen T, Gavillet B, Apothéloz F, Cordonier S, Staub O, Rotin D, Abriel H. Molecular determinants of voltage-gated sodium channel regulation by the Nedd4/Nedd4-like proteins. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005;**288**:C692-701.
- Rougier JS, Abriel H. Cardiac voltage-gated calcium channel macromolecular complexes. *Biochim Biophys Acta*. 2016;**1863**:1806-12.
- Roux B, MacKinnon R. The cavity and pore helices in the KcsA K<sup>+</sup> channel: electrostatic stabilization of monovalent cations. *Science* 1999;**285**:100-102.
- Ruan Y, Liu N, Bloise R, Napolitano C, Priori SG. Gating properties of SCN5A mutations and the response to mexiletine in long-QT syndrome type 3 patients. *Circulation* 2007;**116**:1137-44.
- Rudy B. Slow inactivation of the sodium conductance in squid giant axons. Pronase resistance. *J Physiol* 1978;**283**:1-21.
- Ruiz-Petrich E, de Lorenzi F, Chartier D. Role of the inward rectifier I<sub>K1</sub> in the myocardial response to hypoxia. *Cardiovasc Res* 1991;**25**:17-26.
- Ruppersberg JP, Schroter KH, Sakmann B, Stocker M, Sewing S, Pongs O. Heteromultimeric channels formed by rat brain potassium-channel proteins. *Nature* 1990;**345**:475-476.
- Ryan DP, da Silva MR, Soong TW, Fontaine B, Donaldson MR, Kung AW, Jongjaroenprasert W, Liang MC, Khoo DH, Cheah JS, Ho SC, Bernstein HS, Maciel RM, Brown RH Jr, Ptáček LJ. Mutations in potassium channel Kir2.6 cause susceptibility to thyrotoxic hypokalemic periodic paralysis. *Cell* 2010;**140**:88-98.
- Saikawa T, Carmeliet E. Slow recovery of the maximal rate of rise ( $V_{max}$ ) of the action potential in sheep cardiac Purkinje fibers. *Pflügers Arch* 1982;**394**:90-93.
- Sakakibara Y, Wasserstrom JA, Furukawa T, Jia H, Arentzen CE, Hartz RS, Singer DH. Characterization of the sodium current in single human atrial myocytes. *Circ Res*. 1992;**71**:535-46.
- Sakakibara Y, Furukawa T, Singer DH, Jia H, Backer CL, Arentzen CE, Wasserstrom JA. Sodium current in isolated human ventricular myocytes. *Am J Physiol*. 1993;**265**:H1301-9.
- Sakmann B, Noma A, Trautwein W. Acetylcholine activation of single muscarinic K<sup>+</sup> channel in isolated pacemaker cells of mammalian heart. *Nature* 1983;**303**:250-253.
- Sakmann B, Trube G. Conductance properties of single inwardly rectifying potassium channels in ventricular cells from guinea-pig heart. *J Physiol* 1984a;**347**:641-657.
- Sakmann B, Trube G. Voltage-dependent inactivation of inward-rectifying single-channel currents in guinea-pig heart cell membrane. *J Physiol* 1984b;**347**:659-683.
- Samie FH, Berenfeld O, Anumonwo J, Mironov SF, Udassi S, Beaumont J, Taffet S, Pertsov AM, Jalife J. Rectification of the background potassium current: a determinant of rotor dynamics in ventricular fibrillation. *Circ Res* 2001;**89**:1216-1223.
- Sampson LJ, Leyland ML, Dart C. Direct interaction between the actin-binding protein filamin-A and the inwardly rectifying potassium channel, Kir2.1. *J Biol Chem*. 2003;**278**:41988-97.
- Sanchez-Chapula JA, Salinas-Stefanon E, Torres-Jacome J, Benavides-Haro DE, Navarro-Polanco RA. Blockade of currents by the antimalarial drug chloroquine in feline ventricular myocytes. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001;**297**:437-445.
- Sanguinetti M, Jurkiewicz N. Two components of cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *J Gen Physiol* 1990;**96**:195-215.

- Sanguinetti M, Jurkiewicz N. Delayed rectifier outward  $K^+$  current is composed of two currents in guinea pig atrial cells. *Am J Physiol* 1991;**260**:H393-H399.
- Sanguinetti M, Jiang C, Curran ME, Keating MT. A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the  $I_{Kr}$  potassium channel. *Cell* 1995;**81**:299-307.
- Sanguinetti MC, Curran ME, Spector PS, Keating MT. Spectrum of HERG  $K^+$  channel dysfunction in an inherited cardiac arrhythmia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996a;**93**:2208-2212.
- Sanguinetti MC, Curran ME, Zou A, Shen J, Spector PS, Atkinson DL, Keating MT. Coassembly of KvLQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac  $I_{Ks}$  potassium channel. *Nature* 1996b;**384**:80-83.
- Sanguinetti M, Tristani-Firouzi M. hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature* 2006;**440**:463-469.
- Saras J, Heldin CH. PDZ domains bind carboxy-terminal sequences of target proteins. *Trends Biochem Sci.* 1996;**21**:455-8.
- Sarmast F, Kolli A, Zaitsev A, Parisian K, Dhamoon AS, Guha PK, Warren M, Anumonwo JM, Taffet SM, Berenfeld O, Jalife J. Cholinergic atrial fibrillation: I(K,ACh) gradients determine unequal left/right atrial frequencies and rotor dynamics. *Cardiovasc Res* 2003;**59**:863-873.
- Sato PY, Musa H, Coombs W, Guerrero-Serna G, Patiño GA, Taffet SM, Isom LL, Delmar M. Loss of plakophilin-2 expression leads to decreased sodium current and slower conduction velocity in cultured cardiac myocytes. *Circ Res.* 2009;**105**:523-6.
- Sato PY, Coombs W, Lin X, Nekrasova O, Green KJ, Isom LL, Taffet SM, Delmar M. Interactions between ankyrin-G, Plakophilin-2, and Connexin43 at the cardiac intercalated disc. *Circ Res.* 2011;**109**:193-201.
- Savelieva I, Kourliouros A, Camm J. Primary and secondary prevention of atrial fibrillation with statins and polyunsaturated fatty acids: review of evidence and clinical relevance. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2010;**381**:1-13.
- Scherer D, Kiesecker C, Kulzer M, Gunth M, Scholz EP, Kathöfer S, Thomas D, Maurer M, Kreuzer J, Bauer A, Katus HA, Karle CA, Zitron E. Activation of inwardly rectifying Kir2.x potassium channels by  $\beta_3$ -adrenoceptors is mediated via different signalling pathways with a predominant role of PKC for Kir2.1 and of PKA for Kir2.2. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2007;**375**:311-322.
- Scherer D, Seyler C, Xynogalos P, Scholz EP, Thomas D, Backs J, Andrassy M, Völkers M, Karle CA, Katus HA, Zitron E. Inhibition of Cardiac Kir Current (IK1) by Protein Kinase C Critically Depends on PKC $\beta$  and Kir2.2. *PLoS One.* 2016;**11**:e0156181.
- Scheuer T. Regulation of sodium channel activity by phosphorylation. *Semin Cell Dev Biol.* 2011;**22**:160-5.
- Schink KO, Tan KW, Stenmark H. Phosphoinositides in Control of Membrane Dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2016;**32**:143-171.
- Schmitt N, Schwarz M, Peretz A, Abitbol I, Attali B, Pongs O. A recessive C-terminal Jervell and Lange-Nielsen mutation of the KCNQ1 channel impairs subunit assembly. *EMBO J* 2000;**19**:332-340.
- Schoppa NE, McCormack K, Tanouye MA, Sigworth FJ. The size of gating charge in wild-type and mutant *Shaker* potassium channels. *Science* 1992;**255**:1712-1715.
- Schott JJ, Alshinawi C, Kyndt F, Probst V, Hoorntje TM, Hulsbeek M, Wilde AA, Escande D, Mannens MM, Le Marec H. Cardiac conduction defects associate with mutations in SCN5A. *Nat Genet* 1999;**23**:20-21.
- Schotten U, Verheule S, Kirchhof P, Goette A. Pathophysiological mechanisms of atrial fibrillation: a translational appraisal. *Physiol Rev.* 2011; **91**:265-325.
- Schram G, Pourrier M, Melnyk P, Nattel S. Differential distribution of cardiac ion channel expression as a basis for regional specialization in electrical function. *Circ Res* 2002;**90**:939-950.
- Schram G, Pourrier M, Wang Z, White M, Nattel S. Barium block of Kir2 and human cardiac inward rectifier currents: evidence for subunit-heteromeric contribution to native currents. *Circ Res* 2003;**59**:328-338.
- Schroer TA. Dynactin. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2004;**20**:759-79.
- Schuhmann K, Voelker C, Hofer GF, Pflugelmeier H, Klugbauer N, Hofmann F, Romanin C, Groschner K. Essential role of the  $\beta$  subunit in modulation of C-class L-type  $Ca^{2+}$  channels by intracellular pH. *FEBS Lett* 1997;**408**:75-80.
- Schultz J, Hoffmüller U, Krause G, Ashurst J, Macias MJ, Schmieder P, Schneider-Mergener J, Oschkinat H. Specific interactions between the syntrophin PDZ domain and voltage-gated sodium channels. *Nat Struct Biol.* 1998;**5**:19-24.

## Bibliografia

- Schulze-Bahr E. Short QT syndrome or Andersen syndrome: yin and yang of Kir2.1 channel dysfunction. *Circ Res* 2005;**96**:703-704.
- Schwartz PJ, Priori SG, Spazzolini C, Moss AJ, Vincent GM, Napolitano C, Denjoy I, Guicheney P, Breithardt G, Keating MT, Towbin JA, Beggs AH, Brink P, Wilde AA, Toivonen L, Zareba W, Robinson JL, Timothy KW, Corfield V, Wattanasirichaigoon D, Corbett C, Haverkamp W, Schulze-Bahr E, Lehmann MH, Schwartz K, Coumel P, Bloise R. Genotype-phenotype correlation in the long-QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias. *Circulation*. 2001;**103**:89-95.
- Schwartz PJ. The congenital long QT syndromes from genotype to phenotype: clinical implications. *J Intern Med*. 2006;**259**:39-47.
- Seiler N. Formation, catabolism and properties of the natural polyamines. En: *Neuropharmacology of polyamines*. Carter C (Eds.). Academic Press;1994:1-30.
- Seino S, Miki T. Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Prog Biophys Mol Biol* 2003;**81**:133-176.
- Sejersted OM, Sjogaard G. Dynamics and consequences of potassium shifts in skeletal muscle and heart during exercise. *Physiol Rev* 2000;**80**:1411-1481.
- Serodio P, Demiera EVS, Rudy B. Cloning of a novel component of A-type K<sup>+</sup> channels operating at subthreshold potentials with unique expression in heart and brain. *J Neurophysiol* 1996;**75**:2174-2179.
- Shah AK, Cohen IS, Datyner NB. Background K<sup>+</sup> current in isolated canine cardiac Purkinje myocytes. *Biophys J* 1987;**52**:519-525.
- Shao D, Baker MD, Abrahamsen B, Rugiero F, Malik-Hall M, Poon WY, Cheah KS, Yao KM, Wood JN, Okuse K. A multi PDZ-domain protein Pdzd2 contributes to functional expression of sensory neuron-specific sodium channel Na(V)1.8. *Mol Cell Neurosci*. 2009;**42**:219-25.
- Shen W, Kurachi Y. Mechanisms of adenosine mediated actions on cellular and clinical cardiac electrophysiology. *Mayo Clin Proc* 1995;**70**:274-291.
- Shen MJ, Choi EK, Tan AY, Lin SF, Fishbein MC, Chen LS, Chen PS. Neural mechanisms of atrial arrhythmias. *Nat Rev Cardiol* 2012;**9**:30-39
- Sheng M, Sala C. PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu Rev Neurosci*. 2001;**24**:1-29.
- Shibata EF, Drury T, Refsun H, Aldrerte V, Giles WR. Contributions of a transient outward current to repolarization in human atrium. *Am J Physiol* 1989;**257**:H1773-H1781.
- Shieh BH, Zhu MY. Regulation of the TRP Ca<sup>2+</sup> channel by INAD in Drosophila photoreceptors. *Neuron*. 1996;**16**:991-8.
- Shieh CC, Coghlan M, Sullivan JP, Gopalakrishnan M. Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacol Rev* 2000;**52**:557-594.
- Shimizu W, Matsuo K, Kokubo Y, Satomi K, Kurita T, Noda T, Nagaya N, Suyama K, Aihara N, Kamakura S, Inamoto N, Akahoshi M, Tomoike H. Sex hormone and gender difference--role of testosterone on male predominance in Brugada syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2007;**18**:415-21.
- Shin HG, LU Z. Mechanism of the voltage sensitivity of IRK1 inward-rectifier K<sup>+</sup> channel block by the polyamine spermine. *J Gen Physiol* 2005;**125**:413-426.
- Shinagawa Y, Satoh H, Noma A. The sustained inward current and inward rectifier K<sup>+</sup> current in pacemaker cells dissociated from rat sinoatrial node. *J Physiol* 2000;**523**:593-605.
- Shy D, Gillet L, Abriel H. Cardiac sodium channel NaV1.5 distribution in myocytes via interacting proteins: the multiple pool model. *Biochim Biophys Acta*. 2013;**1833**:886-94.
- Shy D, Gillet L, Ogrodnik J, Albesa M, Verkerk AO, Wolswinkel R, Rougier JS, Barc J, Essers MC, Syam N, Marsman RF, van Mil AM, Rotman S, Redon R, Bezzina CR, Remme CA, Abriel H. PDZ domain-binding motif regulates cardiomyocyte compartment-specific NaV1.5 channel expression and function. *Circulation*. 2014;**130**:147-60.
- Shyng SL, Sha Q, Ferrigni T, Ipatin AN, Nichols CG. Depletion of intracellular polyamines relieves inward rectification of potassium channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;**93**:12014-12019.
- Shyng SL, Cukras CA, Harwood J, Nichols CG. Structural determinants of PIP<sub>2</sub> regulation of inward rectifier K<sub>ATP</sub> channels. *J Gen Physiol* 2000;**116**:599-608.
- Siegelbaum SA, Tsien RW, Kass RS. Role of intracellular calcium in the transient outward current of calf Purkinje fibers. *Nature* 1977;**269**:611-613.
- Sigworth FJ. Voltage gating of ion channels. *Q Rev Biophys* 1994;**27**:1-40.

- Skanes AC, Mandapati R, Berenfeld O, Davidenko JM, Jalife J. Spatiotemporal periodicity during atrial fibrillation in the isolated sheep heart. *Circulation* 1998; **98**: 1236–1248.
- Smith PL, Baukrowitz T, Yellen G. The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel. *Nature* 1996; **379**:833-836.
- Smits JP, Koopmann TT, Wilders R, Veldkamp MW, Ophof T, Bhuiyan ZA, Mannens MM, Balser JR, Tan HL, Bezzina CR, Wilde AA. A mutation in the human cardiac sodium channel (E161K) contributes to sick sinus syndrome, conduction disease and Brugada syndrome in two families. *J Mol Cell Cardiol*. 2005; **38**:969–981.
- Snyders DJ, Tamkun MM, Bennett PB. A rapidly activating and slowly inactivating potassium channel cloned from human heart: Functional analysis after stable mammalian cell culture expression. *J Gen Physiol* 1993; **101**:513-543.
- Snyders DJ. Structure and function of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res* 1999; **42**:377-390.
- Söderberg O, Gullberg M, Jarvius M, Ridderstråle K, Leuchowius KJ, Jarvius J, Wester K, Hydrbring P, Bahram F, Larsson LG, Landegren U. Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nat Methods*. 2006; **3**:995-1000.
- Soh H, Goldstein SA.  $I_{SA}$  channel complexes include four subunits each of DPP6 and Kv4.2. *J Biol Chem* 2008; **283**:15072-15077.
- Songyang Z, Fanning AS, Fu C, Xu J, Marfatia SM, Chishti AH, Crompton A, Chan AC, Anderson JM, Cantley LC. Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science*. 1997; **275**:73-7.
- Sottas V, Abriel H. Negative-dominance phenomenon with genetic variants of the cardiac sodium channel Nav1.5. *Biochim Biophys Acta*. 2016; **1863**:1791-8.
- Spector PS, Curran ME, Keating MT, Sanguinetti M. Class III anti-arrhythmic drugs blocks HERG, a human cardiac delayed rectifier  $K^+$  channel. Open-channel block by methanesulfonanilides. *Circ Res* 1996a; **78**:499-503.
- Spector PS, Curran ME, Zou A, Keating MT, Sanguinetti MC. Fast inactivation causes rectification of the  $I_{Kr}$  channel. *J Gen Physiol* 1996b; **107**:611-619.
- Splawski I, Shen J, Timothy KW, Lehmann MH, Priori SG, Robinson JL, Moss AJ, Schwartz PJ, Towbin JA, Vincent GM, Keating MT. Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2. *Circulation* 2000; **102**:1178-1185.
- Splawski I, Timothy KW, Tateyama M, Clancy CE, Malhotra A, Beggs AH, Cappuccino FP, Sagnella GA, Kass RS, Keating MT. Variant of SCN5A sodium channel implicated in risk of cardiac arrhythmia. *Science* 2002; **297**:1333-1336.
- Standen NB, Stanfield PR. Potassium depletion and sodium block of potassium currents under hyperpolarization in frog sartorius muscle. *J Physiol* 1979; **294**:497-520.
- Stanfield PR, Davies NW, Shelton PA, Sutcliffe MJ, Khan IA, Brammar WJ, Conley EC. A single aspartate residue is involved in both intrinsic gating and blockage by  $Mg^{2+}$  of the inward rectifier, IRK1. *J Physiol* 1994; **478**:1-6.
- Stanfield PR, Nakajima S, Nakajima Y. Constitutively active and G-protein coupled inward rectifier  $K^+$  channels: Kir2.0 and Kir3.0. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2002; **145**:47-179.
- Stiffler MA, Chen JR, Grantcharova VP, Lei Y, Fuchs D, Allen JE, Zaslavskaja LA, MacBeath G. PDZ domain binding selectivity is optimized across the mouse proteome. *Science*. 2007; **317**:364-9.
- Stricker NL, Christopherson KS, Yi BA, Schatz PJ, Raab RW, Dawes G, Bassett DE Jr, Bredt DS, Li M. PDZ domain of neuronal nitric oxide synthase recognizes novel C-terminal peptide sequences. *Nat Biotechnol*. 1997; **15**:336-42.
- Stühmer W, Conti F, Suzuki H, Wang X, Noda M, Yahagi N, Kubo H, Numa S. Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature* 1989; **339**:597-603.
- Sunami A, Fan Z, Nakamura F, Naka M, Tanaka T, Sawanobori T, Hiraoka M. The catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase directly inhibits sodium channel activities in guinea-pig ventricular myocytes. *Pflugers Arch*. 1991; **419**:415-7.
- Swartz MF, Fink GW, Lutz CJ, Taffet SM, Berenfeld O, Vikstrom KL, Kasprovicz K, Bhatta L, Puskas F, Kalifa J, Jalife J. Left vs. right atrial difference in dominant frequency,  $K(+)$  channel transcripts, and fibrosis in patients developing atrial fibrillation after cardiac surgery. *Heart Rhythm* 2009; **6**: 1415-1422.
- Takahashi N, Morishige K, Jahangir A, Yamada M, Findlay I, Koyama H, Kurachi Y. Molecular cloning and functional expression of cDNA encoding a second class of inward rectifier potassium channels in the mouse brain. *J Biol Chem* 1994; **269**:23274-23279.

## Bibliografía

- Takumi T, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning of a membrane protein that induces a slow voltage-gated potassium current. *Science* 1988;**242**:1042-1045.
- Tamargo J. Drug-induced torsades de pointes: from molecular biology to bedside. *Jpn J Pharmacol* 2000;**83**:1-19.
- Tamargo J, Caballero R, Gómez R, Valenzuela C, Delpón E. Pharmacology of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res* 2004;**62**:9-33.
- Tamargo J, Caballero R, Gómez R, Delpón E.  $I_{Kur}$ /Kv1.5 channel blockers for the treatment of atrial fibrillation. *Expert Opin Investig Drugs* 2009;**18**:399-416.
- Tan HL, Bink-Boelkens MT, Bezzina CR, Viswanathan PC, Beaufort-Krol GC, van Tintelen PJ, van den Berg MP, Wilde AA, Balse JR. A sodium-channel mutation causes isolated cardiac conduction disease. *Nature* 2001;**409**:1043-1047.
- Tao X, Avalos JL, Chen J, MacKinnon R. Crystal structure of the eukaryotic strong inward-rectifier K<sup>+</sup> channel Kir2.2 at 3.1 Å resolution. *Science* 2009;**326**:1668-74.
- Tateyama M, Kurokawa J, Terrenoire C, Rivolta I, Kass RS. Stimulation of protein kinase C inhibits bursting in disease-linked mutant human cardiac sodium channels. *Circulation*. 2003;**107**:3216-22.
- Terlau H, Heinemann SH, Stuhmer W, Pusch M, Conti F, Imoto K, Numa S. Mapping the site of block by tetrodotoxin and saxitoxin of sodium channel II. *FEBS Lett* 1991;**293**:93-96.
- Terzic A, Vivaudou M, Moreau C, Olson TM, Jahangir A, Zingman LV, Alekseev AE. Channelopathies of cardiac inwardly rectifying potassium channels. En: *Electrical diseases of the heart: genetics, mechanisms, treatment, prevention*. Gussak I, Antzelevitch C. Springer-Verlag 2008:207-217.
- Tester DJ, Arya P, Will M, Haglund CM, Farley AL, Makielski JC, Ackerman MJ. Genotypic heterogeneity and phenotypic mimicry among unrelated patients referred for catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia genetic testing. *Heart Rhythm* 2006;**3**:800-805.
- Tikhonov DB, Zhorov BS. Molecular modeling of benzothiazepine binding in the L-type calcium channel. *J Biol Chem*. 2008;**283**:17594-604.
- Tikhonov DB, Zhorov BS. Structural model for dihydropyridine binding to L-type calcium channels. *J Biol Chem*. 2009;**284**:19006-17.
- Tonikian R, Zhang Y, Sazinsky SL, Currell B, Yeh JH, Reva B, Held HA, Appleton BA, Evangelista M, Wu Y, Xin X, Chan AC, Seshagiri S, Lasky LA, Sander C, Boone C, Bader GD, Sidhu SS. A specificity map for the PDZ domain family. *PLoS Biol*. 2008;**6**:e239.
- Töpert C, Döring F, Wischmeyer E, Karschin C, Brockhaus J, Ballanyi K, Derst C, Karschin A. Kir2.4: a novel K<sup>+</sup> inward rectifier channel associated with motoneurons of cranial nerve nuclei. *J Neurosci* 1998;**18**:4096-4105.
- Tsai TD, Shuck ME, Thompson DP, Bienkowski MJ, Lee KS. Intracellular H<sup>+</sup> inhibits a cloned rat kidney outer medulla K<sup>+</sup> channel expressed in *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol* 1995;**268**:C1173-C1178.
- Tucker SJ, Pessia M, Adelman JP. Muscarine-gated K<sup>+</sup> channel: Subunit stoichiometry and structural domains essential for G protein stimulation. *Am J Physiol* 1996;**271**:H379-H385.
- Ueda K, Valdivia C, Medeiros-Domingo A, Tester DJ, Vatta M, Farrugia G, Ackerman MJ, Makielski JC. Syntrophin mutation associated with long QT syndrome through activation of the nNOS-SCN5A macromolecular complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;**105**:9355-9360.
- Ulbricht W. Sodium channel inactivation: Molecular determinants and modulation. *Physiol Rev* 2005;**85**:1271-1301.
- Vaidyanathan R, Taffet SM, Vikstrom KL, Anumonwo JM. Regulation of cardiac inward rectifier potassium current (I(K1)) by synapse-associated protein-97. *J Biol Chem*. 2010;**285**:28000-9.
- Vaidyanathan R, Vega AL, Song C, Zhou Q, Tan BH, Berger S, Makielski JC, Eckhardt LL. The interaction of caveolin 3 protein with the potassium inward rectifier channel Kir2.1: physiology and pathology related to long qt syndrome 9 (LQT9). *J Biol Chem*. 2013;**288**:17472-80.
- Valdivia CR, Ueda K, Ackerman MJ, Makielski JC. GPD1L links redox state to cardiac excitability by PKC-dependent phosphorylation of the sodium channel SCN5A. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;**297**:1446-52.
- Valenzuela C, Delpón E, Tamkun MM, Tamargo J, Snyders DJ. Stereoselective block of a human cardiac potassium channel (Kv1.5) by bupivacaine enantiomers. *Biophys J* 1995;**69**:418-427.
- Vallee RB, Williams JC, Varma D, Barnhart LE. Dynein: An ancient motor protein involved in multiple modes of transport. *J Neurobiol*. 2004;**58**:189-200.

- Van Bemmelen MX, Rougier JS, Gavillet B, Apothéloz F, Daidié D, Tateyama M, Rivolta I, Thomas MA, Kass RS, Staub O, Abriel H. Cardiac voltage-gated sodium channel Nav1.5 is regulated by Nedd4-2 mediated ubiquitination. *Circ Res*. 2004;**95**:284-91.
- Van Der Blik AM, Redelmeier TE, Damke H, Tisdale EJ, Meyerowitz EM, Schmid SL. Mutations in human dynamin block an intermediate stage in coated vesicle formation. *J Cell Biol*. 1993;**122**(3):553-63.
- Van Norstrand DW, Valdivia CR, Tester DJ, Ueda K, London B, Makielski JC, Ackerman JC. Molecular and functional characterization of novel glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 like gene (GPD1-L) mutations in sudden infant death syndrome. *Circulation* 2007;**116**:2253-2259.
- Van Wagoner DR, Pond AL, McCarthy PM, Trimmer JS, Nerbonne JM. Outward K<sup>+</sup> current densities and Kv1.5 expression are reduced in chronic human atrial fibrillation. *Circ Res* 1997;**80**:772-781.
- Vandenberg CA. Inward rectification of a potassium channel in cardiac ventricular cells depends on internal magnesium ions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;**84**:2560-2564.
- Vaquero M, Caballero R, Gómez R, Núñez L, Tamargo J, Delpón E. Effects of atorvastatin and simvastatin on atrial plateau currents. *J Mol Cell Cardiol* 2007;**42**:931-945.
- Vaquero M, Calvo D, Jalife J. Cardiac fibrillation: from ion channels to rotors in the human heart. *Heart Rhythm* 2008;**5**:872-9.
- Varro A, Nanasi PP, Lathrop DA. Potassium currents in isolated human atrial and ventricular cardiocytes. *Acta Physiol Scand* 1993;**149**:133-142.
- Vatta M, Dumaine R, Varghese G, Richard TA, Shimizu W, Aihara N, Nademanee K, Brugada R, Brugada J, Veerakul G, Li H, Bowles NE, Brugada P, Antzelevitch C, Towbin JA. Genetic and biophysical basis of sudden unexplained nocturnal death syndrome (SUNDS), a disease allelic to Brugada syndrome. *Hum Mol Genet* 2002;**11**:337-345.
- Vatta M, Ackerman MJ, Ye B, Makielski JC, Ughanze EE, Taylor EW, Tester DJ, Balijepalli RC, Foell JD, Li Z, Kamp TJ, Towbin JA. Mutant caveolin-3 induces persistent late sodium current and is associated with long-QT syndrome. *Circulation* 2006;**114**:2104-2112.
- Veldkamp MW, Viswanathan PC, Bezzina C, Baartscheer A, Wilde AA, Balsler JR. Two distinct congenital arrhythmias evoked by a multidysfunctional Na<sup>+</sup> channel. *Circ Res* 2000;**33**:5-15.
- Veerman CC, Wilde AA, Lodder EM. The cardiac sodium channel gene SCN5A and its gene product Nav1.5: Role in physiology and pathophysiology. *Gene*. 2015;**573**:177-87.
- Verkerk AO, Remme CA, Schumacher CA, Scicluna BP, Wolswinkel R, de Jonge B, Bezzina CR, Veldkamp MW. Functional Nav1.8 channels in intracardiac neurons: the link between SCN10A and cardiac electrophysiology. *Circ Res*. 2012;**111**:333-43.
- Vikstrom KL, Vaidyanathan R, Levinsohn S, O'Connell RP, Qian Y, Crye M, Mills JH, Anumonwo JM. SAP97 regulates Kir2.3 channels by multiple mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;**297**:H1387-97.
- Vilin YY, Makita M, George AL, Ruben PC. Structural determinants of slow inactivation in human cardiac and skeletal muscle sodium channel. *Biophys J* 1999;**77**:1384-1393.
- ViraG L, Iost N, Opincariu M, Szolnoky J, Szecsi J, Bogats G, Szenohradszky P, Varro A, Papp JG. The slow component of the delayed rectifier potassium current in undiseased human ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 2001;**49**:790-797.
- Voigt N, Trausch A, Knaut M, Matschke K, Varró A, Van Wagoner DR, Nattel S, Ravens U, Dobrev D. Left-to-right atrial inward rectifier potassium current gradients in patients with paroxysmal versus chronic atrial fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2010;**3**:472-80.
- Wada K, Yokotani N, Hunter C, Doi K, Wenthold RJ, Shimasaki S. Differential expression of two distinct forms of mRNA encoding members of a dipeptidyl aminopeptidase family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;**89**:197-201.
- Wallace RH, Wang DW, Singh R, Scheffer IE, George AL Jr, Phillips HA, Saar K, Reis A, Johnson EW, Sutherland GR, Berkovic SF, Mulley JC. Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na<sup>+</sup>-channel  $\beta$ 1 subunit gene SCN1B. *Nat Genet* 1998;**19**:366-370.
- Wang C, Hennessey JA, Kirkton RD, Wang C, Graham V, Puranam RS, Rosenberg PB, Bursac N, Pitt GS. Fibroblast growth factor homologous factor 13 regulates Na<sup>+</sup> channels and conduction velocity in murine hearts. *Circ Res*. 2011;**109**:775-82.
- Wang K, Richards FM. An approach to nearest neighbor analysis of membrane proteins. Application to the human erythrocyte membrane of a method employing cleavable cross-linkages. *J Biol Chem*. 1974;**249**:8005-18.

## Bibliografia

- Wang Q, Shen J, Splawski I, Atkinson D, Li Z, Robinson JL, Moss AJ, Towbin JA, Keating MT. SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell* 1995;**80**:805-811.
- Wang Z, Fermini B, Nattel S. Sustained depolarization-induced outward current in human atrial myocytes: Evidence for a novel delayed rectifier K<sup>+</sup> current similar to Kv1.5 cloned channel currents. *Circ Res* 1993;**73**:1061-1076.
- Wang Z, Fermini B, Nattel S. Rapid and slow components of delayed rectifier current in human atrial myocytes. *Cardiovasc Res* 1994;**28**:1540-1546.
- Wang Z, Kiehn J, Yang Q, Brown AM, Wible BA. Comparison of binding and block produced by alternatively spliced Kv $\beta$ 1 subunits. *J Biol Chem* 1996;**271**:28311-28317.
- Wang Z, Yue L, White M, Pelletier G, Nattel S. Differential distribution of inward rectifier potassium channel transcripts in human atrium versus ventricle. *Circulation* 1998;**98**:2422-2428.
- Wang J, Myers CD, Robertson GA. Dynamic control of deactivation gating by a soluble amino-terminal domain in HERG K<sup>+</sup> channel. *J Gen Physiol* 2000;**115**:749-758.
- Wang H, Yan Y, Liu Q, Huang Y, Shen Y, Chen L, Chen Y, Yang Q, Hao Q, Wang K, Chai J. Structural basis for modulation of Kv4 K<sup>+</sup> channels by auxiliary KChIP subunits. *Nat Neurosci* 2007;**10**:32-39.
- Warren M, Guha PK, Berenfeld O, Zaitsev A, Anumonwo JM, Dhamoon AS, Bagwe S, Taffet SM, Jalife J. Blockade of the inward rectifying potassium current terminates ventricular fibrillation in the guinea pig heart. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2003;**14**:621-631.
- Watanabe S, Kusama-Eguchi K, Kobayashi H, Igarashi K. Estimation of polyamine binding to macromolecules and ATP in bovine lymphocytes and rat liver. *J Biol Chem* 1991;**266**:20803-20809.
- Watanabe H, Koopmann TT, Le Scouarnec S, Yang T, Ingram CR, Schott JJ, Demolombe S, Probst V, Anselme F, Escande D, Wiesfeld AC, Pfeufer A, Kääh S, Wichmann HE, Hasdemir C, Aizawa Y, Wilde AA, Roden DM, Bezzina CR. Sodium channel  $\beta$ 1 subunit mutations associated with Brugada syndrome and cardiac conduction disease in humans. *J Clin Invest* 2008;**118**:2260-8.
- Watanabe H, Darbar D, Kaiser DW, et al. Mutations in sodium channel  $\beta$  1- and  $\beta$  2-subunits associated with atrial fibrillation. *Circ Arrhythmia Electrophysiol* 2009;**2**:268 - 275.
- Watanabe H, Nogami A, Ohkubo K, et al. Electrocardiographic characteristics and SCN5A mutations in idiopathic ventricular fibrillation associated with early repolarization. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2011;**4**:874-881.
- Wei J, Wang D, Alings M, Fish F, Wathen M, Roden D, George A Jr. Congenital long-QT syndrome caused by a novel mutation in a conserved acidic domain of the cardiac Na<sup>+</sup> channel. *Circulation* 1999;**99**:3165-3171.
- Weidmann S. The effect of the cardiac membrane potential on the rapid availability of the sodium-carrying system. *J Physiol* 1955a;**127**:213-224.
- Weidmann S. Rectifier properties of Purkinje fibers. *Am J Physiol* 1955b;**183**:671.
- Westfall MV, Rust EM, Metzger JM. Slow skeletal troponin I gene transfer, expression, and myofilament incorporation enhances adult cardiac myocyte contractile function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;**94**:5444-9.
- Wettwer E, Amos G, Gath J, Zerkowski HR, Reidemeister JG, Ravens U. Transient outward current in human and rat ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 1993;**27**:1662-1669.
- Wettwer E, Amos GJ, Posival H, Ravens U. Transient outward current in human ventricular myocytes of subepicardial and subendocardial origin. *Circ Res* 1994;**75**:473-482.
- Wettwer E, Hála O, Christ T, Heubach JF, Dobrev D, Knaut M, Varró A, Ravens U. Role of  $I_{Kur}$  in controlling action potential shape and contractility in the human atrium. Influence of chronic atrial fibrillation. *Circulation* 2004;**110**:2299-2306.
- White MM, Chen LQ, Kleinfeld R, Kallen RG, Barchi RL. SkM2, a Na<sup>+</sup> channel cDNA clone from denervated skeletal muscle, encodes a tetrodotoxin-insensitive Na<sup>+</sup> channel. *Mol Pharmacol* 1991;**39**:604-8.
- Wible BA, De Biasi M, Majumder K, Taglialatela M, Brown AM. Cloning and functional expression of an inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel from human atrium. *Circ Res* 1995;**76**:343-350.
- Wible BA, Yang Q, Kuryshv YA, Accili EA, Brown AM. Cloning and expression of a novel K<sup>+</sup> channel regulatory protein, KChAP. *J Biol Chem* 1998;**273**:11745-11751.
- Wible BA, Wang L, Kuryshv YA, Basu A, Haldar S, Brown AM. Increased K<sup>+</sup> efflux and apoptosis induced by the potassium channel modulatory protein KChAP/PIAS3 $\beta$  in prostate cancer cells. *J Biol Chem* 2002;**277**:17852-12862.

- Whicher JR, MacKinnon R. Structure of the voltage-gated K<sup>+</sup> channel Eag1 reveals an alternative voltage sensing mechanism. *Science*. 2016;**353**:664-9.
- Wickman K, Nemeč J, Gendler SJ, Clapham DE. Abnormal heart rate regulation in GIRK4 knockout mice. *Neuron* 1998;**20**:103-114.
- Wiener N, Rosenblueth A. The mathematical formulation of the problem of conduction of impulses in a network of connected excitable elements, specifically in cardiac muscle. *Arch Inst Cardiol Mex*. 1946;**16**:205-65.
- Wijffels MC, Dorland R, Mast F, Allessie MA. Widening of the excitable gap during pharmacological cardioversion of atrial fibrillation in the goat: effects of cibenzoline, hydroquinidine, flecainide, and D-sotalol. *Circulation* 2000;**102**: 260–267.
- Wilde AA, Brugada R. Phenotypical manifestations of mutations in the genes encoding subunits of the cardiac sodium channel. *Circ Res*. 2011;**108**:884-97.
- Wilde AA, Postema PG. Bringing home the bacon? The next step in cardiac sodium channelopathies. *J Clin Invest*. 2015;**125**:99-101.
- Willis BC, Ponce-Balbuena D, Jalife J. Protein assemblies of sodium and inward rectifier potassium channels control cardiac excitability and arrhythmogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015;**308**:1463-73.
- Winfree AT. When Time Breaks Down: The Three-Dimensional Dynamics of Electrochemical Waves and Cardiac Arrhythmias. *Princeton University Press* 1987.
- Wissmann R, Baukrowitz T, Kalbacher H, Kalbitzer HR, Ruppersberg JP, Pongs O, Antz C, Fakler B. NMR structure and functional characteristics of the N-terminus of the potassium channel  $\beta$ -subunit Kv $\beta$ 1.1. *J Biol Chem* 1999;**274**:35521-35525.
- Workman AJ, Kane KA, Rankin AC. The contribution of ionic currents to changes in refractoriness of human atrial myocytes associated with chronic atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2001;**52**:226-235.
- Wu G, Ai T, Kim JJ, Mohapatra B, Xi Y, Li Z, Abbasi S, Purevjav E, Samani K, Ackerman MJ, Qi M, Moss AJ, Shimizu W, Towbin JA, Cheng J, Vatta M.  $\alpha$ -1-Syntrophin mutation and the long-QT syndrome: A disease of sodium channel disruption. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2008;**1**:193-201.
- Wu J, Lipsius S. Effects of extracellular Mg<sup>2+</sup> on T- and L-Type Ca<sup>2+</sup> currents in single atrial myocytes. *Am J Physiol* 1990;**259**:H1842-H1850.
- Wu L, Yong SL, Fan C, Ni Y, Yoo S, Zhang T, Zhang X, Obejero-Paz CA, Rho HJ, Ke T, Szafranski P, Jones SW, Chen Q, Wang QK. Identification of a new cofactor, MOG1, required for the full function of cardiac sodium channel Nav 1.5. *J Biol Chem*. 2008;**283**:6968-78.
- Xia H, Winokur ST, Kuo WL, Altherr MR, Bretz DS. Actinin-associated LIM protein: identification of a domain interaction between PDZ and spectrin-like repeat motifs. *J Cell Biol*. 1997;**139**:507-15.
- Xia M, Jin Q, Bendahhou S, He Y, Larroque MM, Chen Y, Zhou Q, Yang Y, Liu Y, Liu B, Zhu Q, Zhou Y, Lin J, Liang B, Li L, Dong X, Pan Z, Wang R, Wan H, Qiu W, Xu W, Eurlings P, Barhanin J, Chen Y. A Kir2.1 gain-of-function mutation underlies familial atrial fibrillation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;**332**:1012-1019.
- Xie LH, Takano M, Noma A. Development of inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel family in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol* 1997;**272**:H1741-H1750.
- Xie LH, John SA, Weiss JN. Inward rectification by polyamines in mouse Kir2.1 channels: synergy between blocking components. *J Physiol* 2003;**550**:67-82.
- Xie LH, John SA, Ribalet B, Weiss JN. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) regulation of strong inward rectifier Kir2.1 channels: multilevel positive cooperativity. *J Physiol* 2008;**586**:1833-1848.
- Xu XZ, Choudhury A, Li X, Montell C. Coordination of an array of signaling proteins through homo- and heteromeric interactions between PDZ domains and target proteins. *J Cell Biol*. 1998;**142**:545-55.
- Yamada M, Inanobe A, Kurachi Y. G protein regulation of potassium ion channels. *Pharmacol Reviews* 1998;**50**:723-757.
- Yamazaki M, Vaquero LM, Hou L, Campbell K, Zlochiver S, Klos M, Mironov S, Berenfeld O, Honjo H, Kodama I, Jalife J, Kalifa J. Mechanisms of stretch-induced atrial fibrillation in the presence and the absence of adrenergic stimulation: interplay between rotors and focal discharges. *Heart Rhythm* 2009;**6**:1009-1017.
- Yamazaki M, Honjo H, Ashihara T, Harada M, Sakuma I, Nakazawa K, Trayanova N, Horie M, Kalifa J, Jalife J, Kamiya K, Kodama I. Regional cooling facilitates termination of spiral-wave reentry through unpinning of rotors in rabbit hearts. *Heart Rhythm*. 2012;**9**:107-14.
- Yan DH, Nishimura K, Yoshida K, Nakahira K, Ehara T, Igarashi K, Ishihara K. Different intracellular polyamine concentrations underlie the difference in the

## Bibliografia

- inward rectifier K<sup>+</sup> currents in atria and ventricles of the guinea-pig heart. *J Physiol* 2005;**563**:713-724.
- Yan J, Wen W, Xu W, Long JF, Adams ME, Froehner SC, Zhang M. Structure of the split PH domain and distinct lipid-binding properties of the PH-PDZ supramodule of alpha-syntrophin. *EMBO J*. 2005;**24**:3985-95.
- Yang NB, Horn R. Evidence for voltage-dependent S4 movement in sodium channel. *Neuron* 1995a;**15**:213-218.
- Yang T, Kupersmidt S, Roden DM. Anti-minK antisense decreases the amplitude of the rapidly activating cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> current. *Circ Res* 1995b;**77**:1246-1253.
- Yang N, George AL Jr, Horn R. Molecular basis of charge movement in voltage-gated sodium channels. *Neuron* 1996;**16**:113-122.
- Yang Y, Xia M, Jin Q, Bendahhou S, Shi J, Chen Y, Liang B, Lin J, Liu Y, Liu B, Zhou Q, Zhang D, Wang R, Ma N, Su X, Niu K, Pei Y, Xu W, Chen Z, Wan H, Cui J, Barhanin J, Chen Y. Identification of a KCNE2 gain-of-function mutation in patients with familial atrial fibrillation. *Am J Hum Genet* 2004;**75**:899-905.
- Yellen G, Jurman ME, Abramson T, MacKinnon R. Mutations affecting internal TEA blockade identify the probable pore-forming region of a K<sup>+</sup> channel. *Science* 1991;**251**:939-942.
- Yellen G. The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature* 2002;**419**:35-42.
- Yeola SW, Rich TC, Uebele VN, Tamkun MM, Snyders DJ. Molecular analysis of a binding site for quinidine in a human cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> channel. Role of S6 in antiarrhythmic drug binding. *Circ Res* 1996;**78**:1105-1114.
- Yokoshiki H, Sunagawa M, Seki T, Sperelakis N. ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in pancreatic, cardiac, and vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1998;**274**:C25-C37.
- Yool AJ, Schwarz TL. Alteration of ionic selectivity of a K<sup>+</sup> channel by mutation of the H5 region. *Nature* 1991;**349**:700-704.
- Yu FH, Catterall WA. Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biology* 2003;**4**:207.1-207.7.
- Yu JY, DeRuiter SL, Turner DL. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;**99**:6047-52.
- Yu SP, Kerchner GA. Endogenous voltage-gated potassium channels in human embryonic kidney (HEK293) cells. *J Neurosci Res* 1998;**52**:612-617.
- Yuan W, Ginsburg K, Bers D. Comparison of sarcolemmal Ca<sup>2+</sup> channel current in rabbit and rat ventricular myocytes. *J Physiol* 1986;**493**:733-746.
- Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*. 2000;**101**:25-33.
- Zamponi GW, Striessnig J, Koschak A, Dolphin AC. The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential. *Pharmacol Rev*. 2015;**67**:821-70.
- Zaritsky JJ, Eckman DM, Wellman GC, Nelson MT, Schwarz TL. Targeted disruption of Kir2.1 and Kir2.2 genes reveals the essential role of the inwardly rectifying K<sup>+</sup> current in K<sup>+</sup>-mediated vasodilation. *Circ Res* 2000;**87**:160-166.
- Zaritsky JJ, Redell JB, Tempel BL, Schwarz TL. The consequences of disrupting cardiac inwardly rectifying K<sup>+</sup> current (I<sub>K1</sub>) as revealed by the targeted deletion of the murine Kir2.1 and Kir2.2 genes. *J Physiol* 2001;**533**:697-710.
- Zaza A, Rocchetti M, Brioschi A, Cantadori A, Ferroni A. Dynamic Ca<sup>2+</sup>-induced inward rectification of K<sup>+</sup> current during the ventricular action potential. *Circ Res* 1998;**82**:947-956.
- Zhabotinsky AM. Periodic course of the oxidation of malonic acid in a solution (Studies on the kinetics of Beolusov's reaction). *Biofizika*. 1964;**9**:306-11.
- Zhang JF, Ellinor PT, Aldrich RW, Tsien RW. Molecular determinants of voltage-dependent inactivation in calcium channels. *Nature* 1994;**372**:97-100.
- Zhang S, Zhou Z, Gong Q, Makielski JC, January CT. Mechanism of block and identification of the verapamil binding domain to HERG potassium channels. *Circ Res*. 1999;**84**:989-98.
- Zhang M, Jiang M, Tseng GN. MinK-related peptide 1 associates with Kv4.2 and modulates its gating function: potential role as β subunit of cardiac transient outward channel? *Circ Res* 2001;**88**:1012-1019.
- Zhang L, Benson DW, Tristani-Firouzi M, Ptacek LJ, Tawil R, Schwartz PJ, George AL Jr, Horie M, Andelfinger G, Snow GL, Fu YH, Ackerman MJ, Vincent GM. Electrocardiographic features in Andersen-Tawil syndrome patients with KCNJ2 genotype. *Circulation* 2005a;**111**:2720-2726.

Zhang Y, Appleton BA, Wiesmann C, Lau T, Costa M, Hannoush RN, Sidhu SS. Inhibition of Wnt signaling by Dishevelled PDZ peptides. *Nat Chem Biol.* 2009;5:217-9.

Zhou J, Jeron A, London B, Han X, Koren G. Characterization of a slowly inactivating outward current in adult mouse ventricular myocytes. *Circ Res* 1998;83:806-814.

Zhou J, Shin HG, Yi J, Shen W, Williams CP, Murray KT. Phosphorylation and putative ER retention signals are required for protein kinase A-mediated potentiation of cardiac sodium current. *Circ Res.* 2002;91:540-6.

Zhou M, Morais-Cabral JH, Mann S, MacKinnon R. Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. *Nature* 2001;411:657-661.

Zhou Y, MacKinnon R. The occupancy of ions in the K<sup>+</sup> selectivity filter: charge balance and coupling of ion binding to a protein conformational change underlie high conduction rates. *J Mol Biol* 2003;333:965-975.

Zhou X, Borén J, Akyürek LM. Filamins in cardiovascular development. *Trends Cardiovasc Med.* 2007;17:222-9.

Zhou AX, Hartwig JH, Akyürek LM. Filamins in cell signaling, transcription and organ development. *Trends Cell Biol.* 2010;20:113-23.

Zimmermann P, Meerschaert K, Reekmans G, Leenaerts I, Small JV, Vandekerckhove J, David G, Gettemans J. PIP(2)-PDZ domain binding controls the association of syntenin with the plasma membrane. *Mol Cell.* 2002;9:1215-25.

Zuhlke RD, Pitt GS, Deisseroth K, Tsien RW, Reuter H. Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels. *Nature* 1999;399:159-162.



## **X. Publicaciones**



Los resultados presentados en esta TESIS DOCTORAL están publicados (o pendientes de publicación) en los siguientes artículos:

1. **Matamoros M\***, Pérez-Hernández M\*, Guerrero-Serna G, Amorós I, Barana A, Núñez M, Ponce-Balbuena D, Sacristán S, Gómez R, Tamargo J, Caballero R, Jalife J, Delpón E. Nav1.5 N-terminal domain binding to  $\alpha$ 1-syntrophin increases membrane density of human Kir2.1, Kir2.2 and Nav1.5 channels. *Cardiovasc Res* 2016;110:279-90.
2. Pérez-Hernández M\*, **Matamoros M\***, Amorós I , Alfayate S, Nieto-Marín P, G. Utrilla R, Tinaquero D, De Andrés R, Ponce-Balbuena D, Willis C, Jiménez E, Guerrero-Serna G, , M da Rocha A, Campbell K, Herron T, Díez-Guerra J, Tamargo J, Jalife J, Caballero R, Delpón E. The trafficking-defective Nav1.5 mutants can concomitantly retain Kir2.1/2.2 channels and decrease the cardiac inward rectifier potassium current ( $I_{K1}$ ). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017. PENDIENTE DE REVISIÓN.
3. Pérez-Hernández M\*, **Matamoros M\***, Amorós I , Alfayate S, Nieto-Marín P, G. Utrilla R, Tinaquero D, Tamargo J, Delpón E, Caballero R. Routes and characteristics of the internalization process of Nav1.5-Kir2.1 channel complexes. *Frontiers* 2017. POR INVITACIÓN.
4. Ponce-Balbuena D, Guerrero-Serna G, Valdivia C, Caballero R, Pérez-Hernández M, **Matamoros M**, Díez-Guerra J, Jiménez E, Monteiro da Rocha A, Herron T, Campell K, Willis C, Alvarado F, Zarzoso M, Ramirez R, Kaur K, Valdivia H, Delpón E, Jalife J. Cardiac Kir2.1 and Nav1.5 channels traffic together to the sarcolemma to control excitability and arrhythmogenesis. *Nature communications* 2017. PENDIENTE DE REVISIÓN.



*“Cheer up, Brian. You know what they say.  
Some things in life are bad,  
They can really make you mad.  
Other things just make you swear and curse.  
When you're chewing on life's gristle,  
Don't grumble, give a whistle!  
And this'll help things turn out for the best  
And  
Always look on the bright side of life!  
Always look on the bright side of life  
If life seems jolly rotten,  
There's something you've forgotten!  
And that's to laugh and smile and dance and sing,  
When you're feeling in the dumps,  
Don't be silly chumps,  
Just purse your lips and whistle -- that's the thing!  
And always look on the bright side of life  
Come on!  
Always look on the bright side of life  
For life is quite absurd,  
And death's the final word.  
You must always face the curtain with a bow!  
Forget about your sin -- give the audience a grin,  
Enjoy it, it's the last chance anyhow!  
So always look on the bright side of death!  
Just before you draw your terminal breath.  
Life's a piece of shit,  
When you look at it.  
Life's a laugh and death's a joke, it's true,  
You'll see it's all a show,  
Keep 'em laughing as you go.  
Just remember that the last laugh is on you!  
And always look on the bright side of life  
Always look on the bright side of life  
Come on guys, cheer up  
Always look on the bright side of life  
Always look on the bright side of life  
Worse things happen at sea you know  
Always look on the bright side of life  
I mean, what have you got to lose?  
you know, you come from nothing  
you're going back to nothing  
what have you lost? Nothing!  
Always look on the bright side of life”*

*“Always Look on the Bright Side of Life”*  
Eric Idle

Interpretada por Monty Python en la película:  
“La vida de Brian”





