

# EL PAPER DE LES SUBUNITATS BETA EN LA REGULACIÓ DEL CANAL DE SODI CARDÍAC ASSOCIAT A LA MORT SOBTA

**Helena RIURÓ**

Dipòsit legal: Gi. 123-2015

<http://hdl.handle.net/10803/285269>

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

## TESI DOCTORAL

**El paper de les subunitats beta en la  
regulació del canal de sodi cardíac associat  
a la mort sobtada**

M. Helena Riuró i Càceres

2014





**Universitat de Girona**

TESI DOCTORAL

**El paper de les subunitats beta en la regulació del canal  
de sodi cardíac associat a la mort sobtada**

M. Helena Riuró i Càceres

2014

Ciències Experimentals i de Sostenibilitat

Dirigida per:

Dr. Ramon Brugada i Dra. Fabiana Scornik

Memòria presentada per optar al títol de doctora per la Universitat de Girona





# Universitat de Girona

Girona, 01 de setembre del 2014

El **Dr. Ramon Brugada i Terradellas**, degà de la Facultat de Medicina de la Universitat de Girona i director del Centre de Genètica Cardiovascular de l'Institut d'Investigació Biomèdica de Girona i de la Universitat de Girona.

La **Dra. Fabiana Scornik**, professora de la Facultat de Medicina de la Universitat de Girona i codirectora de la unitat d'electrofisiologia del Centre de Genètica Cardiovascular de l'Institut d'Investigació Biomèdica de Girona i de la Universitat de Girona.

DECLAREM:

Que el treball titulat "**El paper de les subunitats beta en la regulació del canal de sodi cardíac associat a la mort sobtada**", que presenta la **M. Helena Riuró i Càceres** per a l'obtenció del títol de doctora, ha estat realitzat sota la nostra direcció i, perquè així consti i tingui els efectes oportuns, signem aquest document.

Dr. Ramon Brugada i Terradellas

Dra. Fabiana Scornik

M. Helena Riuró i Càceres



**A tu**

*“pren tot el fruit que et pugui donar  
el camí que, a poc a poc, escrius per a demà.*

*Què demà mancarà el fruit de cada pas;  
per això, malgrat la boira, cal caminar.”*

*Lluís Llach*





## Agraïments

---

Bé, ha arribat el moment d'escriure les línies d'agraïment... És difícil decidir quina serà la primera frase, i de quina manera puc agrair el suport rebut de tota la gent del meu entorn que m'ha ajudat a poder superar aquests anys. Intentaré sense emocionar-me gaire... donar les gràcies a totes aquelles persones que han estat i viscut aquest procés.

Vull començar per agrair als meus directors de tesi, la Fabi i en Ramon, el seu suport i direcció en els articles i en l'escriptura de la tesi. Gràcies Ramon per haver-me donat l'oportunitat de fer la tesi en el CGC, per haver-me deixat formar part des de l'inici d'aquest projecte, que ha anat creixent i hem anat tirant endavant. Gràcies Fabi perquè des dels inicis has sigut una persona propera, treballar al teu costat ha sigut un plaer, gràcies. Gràcies a tots dos per ajudar-me a tirar els projectes endavant i aconseguir-ho.

A tu Pedro, crec no cal que et digui res... ja saps com t'agraeixo tot el que has fet per mi tots aquests anys. Ets dels millors companys que es poden tenir.

A les *doctores en projecte*!! Alexandra, Mireia, Cris, Mònica, Anna petita, Javi, Txus, Olallo, Mel·lina i Bernat. Som un súper equip de doctors/es en projecte del CGC, sense vosaltres hagués costat molt tirar endavant. Aquesta tesi és per a vosaltres, i no només us vull donar les gràcies pel vostre suport, sinó també us vull donar molts ànims a vosaltres per la tesi. Gent que ja ho tenim això!!! També, a les *doctores en projecte* infiltrades, Irene, Catarina, Eli, Anna *superpetita*, i Ferranot!, gràcies per les hores passades i el suport donat.

I encara em queda una llista llarga! Aquesta tesi també és per vosaltres i gràcies a vosaltres: Guillermo, Anna gran, Òscar, Sara (gràcies també per donar-me la possibilitat d'entrar a NinsLab!), Marcel, Joan, als estudiants que

han passat, que hi són, i hi passaran, a l'Eva i l'Eli del deganat i a en Branda. A tots als coautors i coautores dels articles. I també a en Josep Brugada, a la Montserrat Batlle, i a tu, Sara Partemi, sense vosaltres no hagués començat en aquest món i no estaria al CGC.

Després de la llarga llista de companyes i companys, amigues i amics de feina, comença la llista d'amigues, amics i família, que si m'ho permeteu us faré en paquets...

A les nenes, vosaltres prou que m'heu aguantat i sobretot les meves absències des de fa un temps. M'ha costat compaginar-ho, i encara que no hagi sigut la meva intenció potser no he estat prou per vosaltres aquests últims mesos (o anys...), espero arreglar-ho ben aviat! A les Maquieres, els meus primers anys de tesi van ser al vostre costat, no ho oblidaré mai. A la gent de l'AEPC, tot i que en el transcurs de la tesi ja no hi estava involucrada, el *tant com puc, sempre apunt i res a mitges* m'ho he hagut de dir moltes vegades al llarg d'aquest temps, per tant, el cau, com sempre, deixa empremta també en aquest tesi.

Riuró *family*, gràcies per estar sempre al meu costat, tenir una família com la nostra ajuda molt a tirar endavant, no et sents mai sola i sempre ajuda el suport incondicional dels teus. Gràcies. I també a la per mi nouvinguda Pellicer-Sabrià *family*, gràcies Neus per les teves correccions i a tots per ser-hi.

Gràcies també a totes les persones que no us puc posar en un paquet, però sabeu que també penso en vosaltres quan dono les gràcies a tota la gent que m'ha donat suport aquests anys.

Finalment, gràcies Mare, Pare, i Núria (i Sergi!), gràcies per ser-hi sempre, gràcies pels consells, gràcies per l'ajuda, gràcies pel suport. I per acabar a tu Guerau, gràcies per ser-hi, gràcies per ajudar-me a posar-me a davant l'ordinador quan ja no podia més, gràcies per aguantar-m'ho tot.

En aquesta tesi hi hem col·laborat moltes persones, i espero i desitjo que totes n'estiguem orgulloses. A totes, gràcies.

## Llista de publicacions derivades de la tesi

---

La tesi que es presenta és en format de compendi d'articles de recerca.

El contingut d'aquesta tesi està basat en les següents publicacions:

**Article 1:** Riuró H, Campuzano O, Berne P, Arbelo E, Iglesias A, Pérez-Serra A, Coll-Vidal M, Partemi S, Mademont-Soler I, Picó F, Allegue C, Oliva A, Gerstenfeld E, Sarquella-Brugada G, Castro-Urda V, Fernández-Lozano I, Mont L, Brugada J, Scornik FS, Brugada R (2014). *Genetic analysis, in silico prediction, and family segregation in Long QT Syndrome*. European Journal of Human Genetics. *In Press*. doi: 10.1038/ejhg.2014.54. Factor d'Impacte: 4.319, Q1 (Genetics & Heredity, 34/161).

**Article 2:** Riuró H, Campuzano O, Arbelo E, Iglesias A, Batlle M, Pérez-Villa F, Brugada J, Pérez, GJ, Scornik, FS, Brugada R (2014). *A missense mutation in the sodium channel  $\beta 1b$  subunit reveals SCN1B as a new gene responsible for Long QT Syndrome*. Heart Rhythm. 11(7):1202-9. doi: 10.1016/j.hrthm.2014.03.044. Factor d'Impacte: 5.045, Q1 (Cardiac & Cardiovascular Systems, 21/124).

**Article 3:** 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 and Brugada R (2013). *A Missense Mutation in the Sodium Channel  $\beta 2$  Subunit Reveals SCN2B as a New Candidate Gene for Brugada Syndrome*. Human Mutation, 34(7):961-6. doi: 10.1002/humu.22328. Factor d'Impacte: 5.213, Q1 (Genetics & Heredity, 22/161).



## Abreviatures

---

<b>Ca<sub>v</sub></b>	Canal de calci depenent de voltatge
<b>DAI</b>	Desfibril·lador Automàtic Implantat
<b>DNA</b>	Àcid desoxiribonucleic o ADN
<b>ECG</b>	Electrocardiograma
<b>EAD</b>	<i>Early afterdepolarization</i> o postdespolaritzacions precoces
<b>FAF</b>	Fibril·lació Auricular Familiar
<b>FV</b>	Fibril·lació Ventricular
<b>I<sub>Ca</sub></b>	Corrent de calci
<b>I<sub>K1</sub></b>	Corrent rectificador entrant de potassi ( <i>inward rectifier potassium current</i> )
<b>I<sub>KL</sub></b>	Corrent rectificador de potassi lent ( <i>slow delayed rectifier potassium current, i<sub>Ks</sub></i> )
<b>I<sub>Kp</sub></b>	Corrent rectificador de potassi tardà
<b>I<sub>Kr</sub></b>	Corrent rectificador de potassi ràpid ( <i>rapidly delayed rectifier potassium current</i> )
<b>I<sub>Kur</sub></b>	Corrent rectificador de potassi ultraràpid ( <i>rapidly delayed rectifier potassium current</i> )
<b>I<sub>Na</sub></b>	Corrent de sodi
<b>I<sub>NaT</sub></b>	Corrent de sodi tardà ( <i>late sodium current, I<sub>NaL</sub></i> )
<b>I<sub>to</sub></b>	Corrent transitori sortint de potassi ( <i>transient outward potassium current</i> )
<b>K<sub>v</sub></b>	Canal de sodi depenent de voltatge
<b>MAF</b>	<i>Minor Allel Frequency</i> , Freqüència de l'Al·lel Menor.

<b>MSC</b>	Mort Sobtada Cardíaca ( <i>Sudden Cardiac Death</i> , SCD)
<b>MSL</b>	Mort Sobtada del Lactant ( <i>Sudden Infant Death Syndrome</i> , SIDS)
<b>NSA</b>	Nòdul Sinoauricular
<b>NAV</b>	Nòdul Auriculoventricular
<b>Na<sub>v</sub></b>	Canal de sodi depenent de voltatge
<b>Na<sub>v</sub>α</b>	Subunitats alfa del canal de sodi depenent de voltatge
<b>Na<sub>v</sub>1.5</b>	Subunitats alfa del canal de sodi cardíac depenent de voltatge
<b>Na<sub>v</sub>β</b>	Subunitats beta del canal de sodi depenent de voltatge
<b>QTc</b>	QT corregit
<b>RE</b>	Reticle Endoplasmàtic
<b>RNA</b>	Àcid Ribonucleic o ARN
<b>PAC</b>	Potencial d'Acció Cardíac
<b>SAT</b>	Síndrome d'Andersen-Tawil
<b>SBr</b>	Síndrome de Brugada ( <i>Brugada Syndrome</i> , BrS)
<b>SJLN</b>	Síndrome de Jervel Lange Nielsen
<b>SPCC</b>	Síndrome Progressiva del Sistema de Conducció Cardíaca o de Lev-ienègre ( <i>Progresive Cardiac Conduction Disease</i> , PCCD).
<b>SQTC</b>	Síndrome del QT curt ( <i>Short QT Syndrome</i> , SQTS)
<b>SQTL</b>	Síndrome del QT llarg ( <i>Long QT Syndrome</i> , LQTS)
<b>SSS</b>	Sick Sinus Syndrome o Síndrome de l'Ankirina-B
<b>ST</b>	Síndrome de Timothy
<b>SNV</b>	<i>Single Nucleotide Variant</i>
<b>TdP</b>	<i>Torsades de pointes</i>
<b>TEA</b>	Tetraethylamonium
<b>TTX</b>	Tetrodotoxina

<b>TV</b>	Taquicàrdia Ventricular
<b>TVPC</b>	Taquicàrdia Ventricular Polimòrfica Catecolaminèrgica, ( <i>Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia</i> , CPVT)
<b>V<sub>m</sub></b>	Potencial de membrana
<b>V<sub>x</sub></b>	Potencial d'equilibri d'un ió X
<b>VUS</b>	<i>Variant with Uncertain Significance</i> o Variant de significat incert
<b>WT</b>	<i>Wild-type</i>

### **Bases de dades**

<b>ESP</b>	<i>Exome Sequencing Project</i> o <i>Exome Variant Server</i> (ESV)
<b>HGMD</b>	<i>The Human Gene Mutation Database</i>
<b>dbSNP</b>	<i>Single Nucleotide Polymorphism database</i>
<b>PROVEAN</b>	<i>Protein Variation Effect Analyzer</i>
<b>Polyphen-2</b>	<i>POLYmorphism PHEnotyping v2</i>
<b>SIFT</b>	<i>Sorting Intolerant from Tolerant</i>
<b>Condel</b>	<i>CONsensus DELeteriousness score of non-synonymous single nucleotide variant</i>





## Índex de taules

---

<b>Taula</b>	<b>Títol</b>	<b>Pàgina</b>
1	Bases genètiques i moleculars dels corrents iònics i la seva alteració en les arítmies cardíques hereditàries	30
2	Taula resum dels gens associats a la SQTL	33
3	Criteris diagnòstics de Schwartz	37
4	Taula resum dels gens associats a la SBr	53
5	Concentracions iòniques i potencial d'equilibri dels diferents ions involucrats en el potencial d'acció en múscul cardíac de mamífer a 37°C	61
6	Subunitats $\alpha$ dels canal de sodi dependents de voltatge	82
7	Modulació i fenotips clínics associats a la interacció de les $Na_v\beta$ amb la $Na_v1.5$ .	97
8A	Resum de les proteïnes que interaccionen i regulen la localització i/o funció de la $Na_v1.5$	102
8B		103



## Índex de figures

---

<b>Figura</b>	<b>Títol</b>	<b>Pàgina</b>
1	Activitat elèctrica cardíaca i els corrents iònics del cor	25
2	Comparació del ECG normal o amb QT llarg	33
3	Imatges representatives d'altres defectes electrocardiogràfics en pacients amb SQTl	35
4	Electrocardiogrames característics en pacients amb SBr	49
5	Esquemes de les dues hipòtesis de mecanisme d'elevació del segment ST en un ECG tipus 1 de SBr	57
6	Relació corrent (I) - voltatge (V) a la membrana cel·lular	63
7	Esquema representatiu de la tècnica de <i>patch clamp</i>	66
8	Registres macroscòpics i de canal únic per <i>patch clamp</i>	68
9	Protocols de voltatge i gràfics resultants dels registres de $I_{Na}$ per <i>whole cell patch clamp</i> , en cèl·lules HEK transfectades	74
10	Protocols de voltatge i gràfics resultants dels registres de $I_{Na}$ corresponents a la recuperació de la inactivació, inactivació profunda, i corrent de sodi tardà	78
11	Relació filogenètica entre els diferents canals de sodi dependents de voltatge	83
12	Estructura de les subunitats $\alpha$ dels canals de sodi dependents de voltatge	84
13	Estructura cristal·litzada de $Na_vAb$	86
14	Estructura de les subunitats $\beta$ dels canals de sodi dependents de voltatge	90
15	Representació de les dues variants d' <i>splicing</i> del gen <i>SCN1B</i>	93

<b>Figura</b>	<b>Títol</b>	<b>Pàgina</b>
16	Representació de l'estructura primària de la Na <sub>v</sub> 1.5 i els llocs d'interacció de les subunitats β i les altres proteïnes accessòries	101
17	Mecanismes de guany de funció del canal de sodi cardíac	108
18	Mecanismes de pèrdua de funció del canal de sodi cardíac	111

# Índex del contingut

---

Agraïments	i
Llista de publicacions derivades de la tesi	iii
Índex d'abreviatures	v
Índex de taules	ix
Índex de figures	xi
<b>Resum</b>	<b>1</b>
Resumen	5
Summary	9
<b>Marc teòric</b>	<b>15</b>
1. Mort Soltada Cardíaca	16
1.1 Definició i epidemiologia	16
1.2. Substrats i mecanismes de la mort soltada cardíaca	17
1.2.1. Mort soltada cardíaca en l'adult	17
1.2.2. Mort soltada del lactant, infants i adolescents	18
2. Activitat elèctrica del cor	20
2.1. Potencial d'acció cardíac	21
2.2. Electrocardiograma	24
2.3. Malalties elèctriques o canalopaties cardíagues	26
3. Síndrome del QT llarg	31
3.1. Fenotip i diagnòstic	32

3.1.1. Prolongació de l'interval QT	32
3.1.2. Defectes en el ECG determinants de SQTL	34
3.1.3. Criteris en la diagnosi clínica	36
3.2. Implicacions diagnòstiques de l'anàlisi genètica en SQTL	37
3.2.1. Gens i mecanismes associats a SQTL	37
3.2.2. Criteris de diagnosi genètica en els pacients amb SQTL	40
3.2.3. Penetrància incompleta i expressivitat variable	41
3.3. Relació genotip-fenotip i estratificació del risc	43
3.4. Implicacions terapèutiques de l'anàlisi genètic	45
4. Síndrome de Brugada	47
4.1. Fenotip i diagnòstic	47
4.1.1. Criteris de diagnòstic	47
4.1.2. Estratificació clínica del risc	49
4.2. Implicacions de la diagnosi genètica en la SBr	51
4.2.1. Gens implicats en la SBr	51
4.2.2. Diagnosi genètica a la pràctica clínica	52
4.2.3. Penetrància incompleta i expressivitat variable	54
4.3. Mecanismes d'elevació del segment ST	55
4.4. Tractament	58
5. Electricitat cel·lular	59
5.1. Propietats elèctriques dels canals iònics dependents de voltatge	60
5.2. Registre dels corrents cel·lulars	64
5.2.1. Registre dels corrents per <i>patch clamp</i>	65
5.2.2. Sistemes d'expressió heteròloga	69

5.3. Propietats biofísiques dels canals de sodi depenent de voltatge	70
5.3.1. Tancat	71
5.3.2. Obert o activat	71
5.3.3. Inactivació ràpida	72
5.3.4. Inactivació tardana o profunda	76
5.3.5. Corrent de sodi tardà	76
6. Estructura del canal de sodi cardíac	79
6.1. Gens, estructura molecular i funció de les subunitats $\alpha$ que formen els canals de sodi dependents de voltatge	80
6.1.1. Gens que codifiquen per les diferents $Na_v\alpha$	80
6.1.2. Estructura molecular i funció les subunitats $Na_v\alpha$	83
6.2. Gens, estructura molecular i funció de les subunitats $\beta$ que formen els canals de sodi dependents de voltatge	87
6.2.1. Gens que codifiquen per les diferents subunitats $Na_v\beta$	87
6.2.2. Estructura molecular i funció de les subunitats $Na_v\beta$	88
6.3. Altres factors moleculars que intervenen en l'obtenció d'un canal funcional a la membrana	98
7. Mecanismes cel·lulars d'alteració del $I_{Na}$ en la SQTL i la SBr	104
7.1. SQTL: Augment de la funció del canal de sodi cardíac	104
7.2. SBr: Disminució de la funció del canal de sodi cardíac	109
<b>Plantejament de la recerca, hipòtesis i objectius</b>	115
<b>Resultats</b>	123
Article 1. Genetic analysis, <i>in silico</i> prediction, and family segregation in Long QT Syndrome.	125



Article 2. A missense mutation in the sodium channel $\beta$ 1b subunit reveals <i>SCN1B</i> as a susceptible gene underlying LQT Syndrome.	143
Article 3. A missense mutation in the sodium channel $\beta$ 2 subunit reveals <i>SCN2B</i> as a new candidate gene for Brugada Syndrome.	157
<b>Discussió</b>	179
1. El paper de l'estudi genètic en la SQTL i la SBr, i del descobriment de nous gens candidats.	181
1.1. Anàlisi genètica, predicció in silico, i segregació familiar en el diagnòstic genètic dels pacients amb SQTL	181
1.2. L'anàlisi genètica de gens minoritaris i gens candidats	188
2. Les mutacions a les $Na_v\beta$ relacionades a la SBr i la SQTL	191
2.1. La subunitat $\beta$ 1bP213T altera la funció de la $Na_v1.5$ , i revela el gen <i>SCN1B</i> com a nou gen candidat per la SQTL	191
2.2. La $\beta$ 2D211G altera la funció de la $Na_v1.5$ , i revela el gen <i>SCN2B</i> com a nou gen candidat responsable de la SBr	194
3. El paper de $Na_v\beta$ 1b i $Na_v\beta$ 2 a la regulació de la $Na_v1.5$	197
3.1. La regulació de la subunitat $\beta$ 1b WT a la funció de la $Na_v1.5$	197
3.2. Els efectes de la subunitat $\beta$ 2 WT a la funció de la $Na_v1.5$	201
4. Limitacions, perspectives i reptes	206
4.1. La penetrància incompleta	206
4.2. La superposició fenotípica	208
4.3. El futur de la diagnòstic genètica en les canalopaties	209
4.4. Estudis de les $Na_v\beta$ i de mutacions in vitro i in vivo	211
<b>Conclusions</b>	215
<b>Bibliografia</b>	219

## Resum

---

La Mort Sobtada Cardíaca (MSC) és una mort natural per causes cardíaques que succeeix després de poc temps d'haver començat els símptomes. S'estima que una de cada 1.000 persones moren a l'any per MSC. En un 70-80% dels casos la mort és a causa d'una alteració coronària, en un 10-15% per cardiomiopatia, i en un 5-10% és a causa d'una alteració elèctrica cardíaca sense cap defecte estructural del cor.

Dins d'aquest 5-10%, es troben les Síndromes de QT Llarg (SQTL) i de Brugada (SBr), les quals es caracteritzen per l'aparició d'arítmies que poden provocar MSC. Aquestes arítmies letals estan determinades per alteracions en els nivells d'expressió i/o en les propietats biofísiques dels canals iònics, que són determinants pel funcionament orquestrat del cor.

En un 60-75% dels pacients amb SQTL i en un 20-35% dels pacients amb SBr, s'identifica la mutació que causa una alteració patogènica de les proteïnes que formen o regulen aquests canals iònics cardíacs. Majoritàriament, les mutacions en els pacients amb SBr, i part dels SQTL, són en gens que codifiquen pel complex dels canal de sodi cardíac dependent de voltatge. El canal de sodi cardíac, és un complex

multiproteic format per una subunitat  $\alpha$  que constitueix el porus del canal ( $\text{Na}_v1.5$ ), unida a una o més de les 5 subunitats  $\beta$  del canal de sodi ( $\text{Na}_v\beta1a$ ,  $\beta1b$ ,  $\beta2$ ,  $\beta3$  i  $\beta4$ ), i altres proteïnes reguladores.

Actualment, un 20-35% dels pacients amb SQTL i un 60-75% dels pacients amb SBr resten sense diagnòstic després de l'anàlisi genètica.

D'altra banda, estudis previs demostren que les mutacions a la subunitat  $\text{Na}_v\beta4$  poden ser responsables de la SQTL, i que les mutacions en les subunitats  $\text{Na}_v\beta1$  i  $\text{Na}_v\beta3$ , en poden ser de la SBr. És per aquests motius que en **aquesta tesi es planteja si les mutacions a les subunitats  $\text{Na}_v\beta$  encara no associades a les respectives malalties, poden ser responsables d'una alteració de la funció de la  $\text{Na}_v1.5$  en els pacients amb SQTL i SBr sense mutació genètica diagnosticada.** En aquesta tesi es presenten tres estudis que van des dels estudis genètics fins als estudis funcionals de mutacions a les  $\text{Na}_v\beta$ , per assolir els objectius plantejats, i contrastar les hipòtesis de treball.

En el primer estudi, s'analitzen genèticament els 5 gens majoritaris relacionats a SQTL en una població de 115 pacients amb aquesta malaltia. Els resultats de l'estudi determinen que després de l'estudi genètic, un 51,3% dels pacients se'ls hi ha identificat mutació en algun dels gens estudiats. Tot i això, igual que en altres estudis, si es posa el focus en els pacients amb un QT corregit molt allargat ( $\text{QT} \geq 500\text{ms}$ ) el percentatge de mutacions trobades augmenta fins a un 75,7%, la qual cosa demostra que la proporció de pacients amb diagnòstic genètic

augmenta amb la severitat de la malaltia. Després de l'anàlisi de patogenicitat — a través de programes de predicció *in silico*, bases de dades i segregació familiar — s'observa que el percentatge de mutacions de patogenicitat incerta és elevat, i que tenir la informació familiar és clau per poder estudiar la segregació de la mutació amb el fenotip, predir la patogenicitat de les mutacions i que disminueixi el número de mutacions catalogades de significat incert. Finalment, el nostre estudi confirma que, tal i com esperàvem, un percentatge elevat de pacients roman sense mutació després de l'estudi genètic.

En el segon estudi, s'analitzen genèticament els 4 gens que codifiquen les 5 subunitats  $\text{Na}_v\beta$  en 30 pacients de SQTL del primer l'article sense mutació diagnosticada inicialment. Després del cribratge, s'ha identificat una mutació potencialment patogènica en el gen que codifica la subunitat  $\text{Na}_v\beta 1$  isoforma b [*SCN1Bb* p.(Pro213Thr)].

Per tal d'estudiar l'efecte d'aquesta mutació, s'han estudiat electrofisiològicament els corrents de la  $\text{Na}_v 1.5$  coexpressada amb la  $\text{Na}_v\beta 1b$  normal o mutada en un sistema d'expressió heteròloga. En aquest estudi es demostra que la mutació *SCN1Bb* p.(Pro213Thr) augmenta significativament el corrent de sodi tardà i incrementa la duració del potencial d'acció. Per tant, el nostre estudi suggereix que la mutació *SCN1Bb* p.(Pro213Thr) és la responsable de la SQTL a la família, i que el gen *SCN1B* és un nou gen potencialment candidat de ser responsable de la SQTL.

Finalment, el tercer article deriva d'un estudi inicial, no inclòs en aquesta tesi, en el qual es van estudiar genèticament les subunitats  $Na_v\beta$  a 38 pacients de SBr sense mutacions als gens descrits prèviament com a responsables d'aquesta malaltia. En aquest rastreig genètic es va identificar una mutació al gen *SCN2B* [*SCN2B* p.(Asp211Gly)].

En el tercer article es presenten els estudis electrofisiològics i bioquímics, realitzats a partir d'un sistema d'expressió heteròloga, per testar la possible causalitat d'aquesta mutació a la subunitat  $Na_v\beta_2$ . Els resultats suggereixen que aquesta mutació causa una disminució del corrent de sodi de la  $Na_v1.5$  per una disminució dels canals a la superfície cel·lular. Per tant, el tercer article d'aquesta tesi revela el gen *SCN2B*, com un nou gen candidat per a l'estudi de mutacions en pacients amb SBr.

En conclusió, els nostres estudis aporten noves evidències de les bases genètiques de la SQTL i la SBr: identifiquen per primera vegada dos gens nous associats a la SQTL i SBr; ressalten la importància de continuar en la cerca de nous gens i mecanismes que puguin donar resposta a l'elevat percentatge de pacients sense diagnòstic genètic en les dues malalties; i finalment, aporten més evidències sobre el paper fonamental de les subunitats  $Na_v\beta$  en la regulació del canal de sodi cardíac.

## Resumen

---

La muerte súbita cardíaca (MSC) es una muerte natural por causas cardíacas que ocurre dentro de un tiempo corto después de haber empezado los síntomas. Se estima que una de cada 1000 personas muere al año por MSC. Un 70-80% de los casos de MSC es debido a una alteración coronaria, un 10-15% a cardiomiopatía, y un 5-10% debido a una alteración eléctrica sin defectos estructurales del corazón.

Dentro de este 5-10% se encuentran los síndromes de QT largo (SQTL) y Brugada (SBr), los cuales se caracterizan por la aparición de arritmias que pueden finalmente provocar la MSC. Se sabe que dichas arritmias, están a menudo determinadas por alteraciones en los niveles de expresión y/o en las propiedades biofísicas de los canales iónicos determinantes en el funcionamiento orquestado del corazón.

En un 60-75% de los pacientes con SQTL y en un 20-35% de los pacientes con SBr, se identifica la mutación que causa la alteración de las proteínas que forman o regulan estos canales iónicos cardíacos. Mayoritariamente, las mutaciones responsables de los SBr, y parte de los SQTL, son en genes que codifican al complejo del canal de sodio

cardíaco dependiente de voltaje. El canal de sodio cardíaco, es un complejo multiproteico formado por una subunidad  $\alpha$  que constituye el poro del canal ( $Na_v1.5$ ), unida a una o más de las 5 subunidades  $\beta$  ( $Na_v\beta1a$ ,  $\beta1b$ ,  $\beta2$ ,  $\beta3$  y  $\beta4$ ), y otras proteínas reguladoras.

Actualmente, un 20-35% de los pacientes con SQTL y un 60-75% de los pacientes con SBr, restan sin diagnosticar después del análisis genético.

Por otro lado, estudios previos demuestran que mutaciones en la subunidad  $Na_v\beta4$  pueden ser responsables del SQTL, y que mutaciones en las subunidades  $Na_v\beta1$  y  $Na_v\beta3$  pueden ser responsables del SBr. **Por lo tanto, en esta tesis se plantea que las mutaciones a las subunidades  $Na_v\beta$  aún no asociadas a las respectivas enfermedades, pueden ser responsables de una alteración de la función de la  $Na_v1.5$  que explique el SQTL y el SBr en pacientes sin mutación diagnosticada.** En esta tesis se presentan tres estudios que van desde el estudio genético hasta los estudios funcionales de mutaciones en las  $Na_v\beta$ , para alcanzar los objetivos planteados y así contrastar las hipótesis de trabajo.

En el primer estudio, se analizan genéticamente los 5 genes mayoritarios relacionados a SQTL en una población de 115 pacientes con esta enfermedad. Los resultados del estudio determinaron que después del estudio genético un 51,3% de los pacientes fueron diagnosticados como portadores de alguna mutación en estos genes. Sin embargo, en concordancia con otros estudios, si se focaliza en los pacientes con un

QT corregido muy largo ( $QT \geq 500$ ms), el porcentaje de mutaciones encontradas aumenta hasta un 75,7%, demostrando que la proporción de pacientes con diagnóstico genético aumenta con la severidad de la enfermedad. Después del análisis de patogenicidad de las mutaciones encontradas — a través de programas de predicción *in silico*, la literatura y la segregación familiar — se observa que el porcentaje de mutaciones con patogenicidad incierta es elevado, y que tener la información familiar es clave para poder estudiar la segregación de la mutación con el fenotipo, predecir la patogenicidad de las mutaciones y disminuir el número de mutaciones catalogadas como de significado incierto. Finalmente, este estudio confirma que, tal y como esperábamos, un porcentaje alto de pacientes de nuestra población permanecen sin diagnóstico después del estudio genético.

En el segundo estudio, se han analizado genéticamente los 4 genes que codifican a las 5 subunidades  $Na_v\beta$  en 30 pacientes de SQT del primer artículo sin mutación diagnosticada inicialmente. Después del rastreo genético, se identificó una mutación potencialmente patogénica en el gen que codifica a la subunidad  $Na_v\beta 1$  isoforma b [*SCN1Bb* p.(Pro213Thr)]. Para analizar el efecto de esta mutación, se estudiaron electrofisiológicamente las corrientes de la  $Na_v 1.5$  coexpressada con la  $Na_v\beta 1b$  normal o mutada en un sistema de expresión heteróloga. El estudio revela que la mutación *SCN1Bb* p.(Pro213Thr) aumenta significativamente la corriente de sodio tardía y la duración del potencial



de acción. Por lo tanto, nuestro estudio sugiere que la mutación *SCN1B* p.(Pro213Thr) es probablemente la responsable del SCTL de la familia, i que el gen *SCN1B* es un nuevo gen potencialmente candidato de SCTL. Finalmente, el tercer estudio deriva de un estudio inicial, no incluido en esa tesis, en el que se habían estudiado genéticamente las subunidades  $Na_v\beta$  en 38 pacientes de SBr sin mutaciones en los genes descritos previamente como responsables de esta enfermedad. Después del rastreo genético se identificó una mutación en el gen *SCN2B* [*SCN2B* p.(Asp211Gly)]. En el tercer artículo se presentan los estudios electrofisiológicos y bioquímicos realizados para testar la posible causalidad de la mutación en la subunidad  $Na_v\beta_2$ . Los estudios demuestran que esta mutación es la responsable de la disminución de la corriente de sodio debido a una disminución del canal de sodio cardíaco a la superficie celular. Por lo tanto, este tercer artículo de la tesis revela al gen *SCN2B*, como un nuevo gen candidato para el estudio de mutaciones en pacientes con SBr.

En conclusión, nuestros estudios aportan nuevas evidencias de las bases genéticas del SCTL y el SBr: identifican por primera vez dos genes nuevos asociados al SCTL y el SBr; resaltan la importancia de la búsqueda de nuevos genes y mecanismos que puedan dar respuesta al porcentaje de pacientes sin diagnóstico genético en las dos enfermedades; y finalmente, aportan más evidencias del papel fundamental de las  $Na_v\beta$  en la regulación del canal de sodio cardíaco.

## Summary

---

Sudden Cardiac Death (SCD) is defined as a natural death due to cardiac causes within a short time of the onset of symptoms. The population incidence is around 1 per 1000 per year. A 70-80% of the SCD cases are related to coronary alterations, a 10-15% to cardiomyopathies, and a 5-10% of SCD are due to electric alterations without structural defects of the heart.

Long QT syndrome (LQTS) and Brugada syndrome (BrS) are within this last 5-10% of SCD without structural defects. Both syndromes are characterized by electrographic alterations and arrhythmias, which may lead to SCD. These alterations are determined by defects in cardiac ion channels expression levels and/or biophysical properties that alter the orchestrated heart function.

Pathogenic mutations in proteins that form or regulate cardiac ion channels are found in around 60-75% of LQTS and 20-35% of BrS patients. Most of the mutations found in BrS patients, and part of mutations in LQTS patients, are identified in genes that encode the proteins forming the voltage-dependent cardiac sodium channel complex.

The cardiac sodium channel is a transmembrane protein complex composed by a pore-forming  $\alpha$  subunit ( $\text{Na}_v1.5$ ), associated with one or more of five auxiliary  $\beta$  subunits ( $\text{Na}_v\beta1a$ ,  $\beta1b$ ,  $\beta2$ ,  $\beta3$  and  $\beta4$ ), and other regulatory proteins.

To date, near 20-35% of LQTS patients and 60-75% of BrS patients remains without genetic diagnosis after screening analysis of LQTS and BrS-previously related genes. On the other hand, previous studies revealed that mutations in  $\text{Na}_v\beta4$  are responsible for LQTS, and mutations  $\text{Na}_v\beta1$  and  $\text{Na}_v\beta3$  are responsible for BrS. **Altogether, our assumption was that mutations in the  $\text{Na}_v\beta$ , still not related to the respective disease, could explain the phenotype in part of the patients without genetic diagnosis after genetic screening.** In this thesis, we present three studies that range from genetic screening analysis to functional studies of mutations in  $\text{Na}_v\beta$ , to achieve the hypothesis and objectives stated.

In our first study, we analyzed genetically the five major genes related to LQTS in 115 patients with this disease. Our results revealed that after the genetic screening 51.3% of patients bared a mutation. However, if we focused only in patients with a really long QT ( $\text{QTc} \geq 500\text{ms}$ ), the percentage of patients with mutation increase to 75.7%, reveling that, in agreement with other studies, the yield of genetic diagnosis increases as the phenotype is more severe. On the other hand, the percentage of mutations of uncertain pathogenic significance was high. Our study

suggests that complete familial genetic and clinic information is necessary to elucidate the segregation of the mutation with the phenotype, to predict the pathogenicity of mutations, and to reduce the number of mutations cataloged as uncertain significance. Finally, this study confirms that a significant proportion of the population remains without diagnosis after the genetic screening.

In our second study, we screened the four genes that encode the five  $\text{Na}_v\beta$  subunits in the 30 LQTS patients from our first study that remained without genetic diagnosis. After this screening, we identified a mutation in the gene that encodes the  $\text{Na}_v\beta 1$  isoform b subunit (*SCN1Bb* p.(Pro213Thr)).

To analyze if this mutation could explain the LQTS in that family, we studied electrophysiologically the  $\text{Na}_v 1.5$  sodium currents in a heterologous system coexpressing  $\text{Na}_v 1.5$  with wild-type (WT) or mutant  $\text{Na}_v\beta 1b$ . Our results revealed that  $\text{Na}_v\beta 1b$  p.(Pro213Thr) increased significantly the late sodium current and significantly prolonged the action potential duration. Thus, our results suggest that *SCN1Bb* p.(Pro213Thr) could be the mutation responsible for the LQTS in the family, revealing for the first time *SCN1B* as a new susceptibility gene responsible for LQTS.

The third study presented derives from a study not presented in this thesis, in which we screened the four genes that encode for the five  $\text{Na}_v\beta$  subunits in 38 BrS patients without mutations in the previously related BrS

genes. In the screening we found a potentially pathogenic mutation in the *SCN2B* gene [*SCN2B* p.(Asp211Gly)].

In the third article we analyzed electrophysiologically and biochemically the putative pathogenic role of this mutant  $\text{Na}_v\beta 2$  subunit. Electrophysiological studies in a heterologous expression system revealed that the sodium current registered in cells coexpressing  $\text{Na}_v 1.5$  together with mutant  $\text{Na}_v\beta 2$ , was significantly reduced compared to  $\text{Na}_v 1.5 + \text{Na}_v\beta 2\text{WT}$ . Biochemical studies demonstrated that this decrease was due to a reduction of  $\text{Na}_v 1.5$  cell surface expression. Therefore, our results revealed that  $\text{Na}_v\beta 2$  could be the mutation responsible for BrS in that family, suggesting for the first time *SCN2B* as a candidate gene underlying BrS.

In conclusion, our studies provide new evidences of the genetic basis of LQTS and BrS: we identify for the first time two new genes responsible for LQTS and BrS; our results highlight the importance of continuing the search for new candidate genes and mechanisms to elucidate the percentage of LQTS and BrS patients remaining without genetic diagnosis; and finally, our studies support the growing evidence of the important role of  $\text{Na}_v\beta$  in the regulation of  $\text{Na}_v 1.5$  function.

**Marc teòric**



La tesi que es presenta a continuació està formada per tres articles que com objectiu principal comú pretenen aprofundir en el coneixement de les bases genètiques de la Mort Sobtada Cardíaca (MSC), en concret de la Síndrome de QT llarg (SQTL) i la Síndrome de Brugada (SBr).

En els últims 20 anys, l'avenç en la recerca de la genètica de la mort sobtada cardíaca ha implicat diversos gens, potencialment susceptibles a mutacions que poden causar aquestes malalties elèctriques cardíques, que en molts casos desenvolupen arítmies letals i la MSC. Tot i això, encara queden moltes preguntes per respondre, entre d'altres, la causa de la malaltia en el percentatge de pacients que romanen sense diagnosticar després de l'estudi genètic.

En aquesta tesi es presenten tres articles. El primer i el segon article estan enfocats a la SQTL. Aquests inclouen des de l'estudi genètic per la identificació de mutacions, fins a l'estudi funcional i electrofisiològic per demostrar la causalitat de les subunitats  $\beta$  del canal de sodi a aquesta síndrome. Estudis paral·lels en el nostre laboratori identificaren una mutació a una d'aquestes subunitats en un pacient de SBr. El tercer



article està dirigit a demostrar la causalitat d'aquesta mutació associada a la SBr. D'aquesta manera, el segon i tercer article profunditzen en les bases genètiques d'aquestes dues malalties, i en els mecanismes fisiològics del paper de les subunitats  $\beta$  en les malalties aritmogèniques. A continuació, es desenvolupa a mode d'introducció general, el marc teòric en el qual s'emmarquen els articles presentats en aquesta tesi.

## **1. Mort Soltada Cardíaca**

En aquest capítol, s'introdueix la principal conseqüència de les malalties cardíaques que s'estudien en aquesta tesi, la MSC. A continuació, es defineix la MSC, i les principals causes i malalties que la promouen.

### **1.1. Definició i epidemiologia**

La MSC es defineix com aquella mort natural de causa cardíaca, després de poc temps que hagin començat els primers símptomes, en un pacient amb o sense història prèvia de malaltia cardiovascular<sup>1-3</sup>.

El temps des de l'aparició dels primers símptomes és determinant a l'hora de valorar l'epidemiologia de la MSC. Si es calcula el percentatge de morts soltades després d'una hora de l'aparició dels primers símptomes (per definició), el percentatge de MSC respecte de totes les morts naturals és del 13%. En canvi, si el temps des de l'aparició dels símptomes és de 24 hores, aquest percentatge augmenta fins al 18,5%; tot i això, encara que en la definició de 24 hores augmenta la fracció de

morts naturals assignades com a sobtades, disminueix el número de morts naturals sobtades per causes cardíaques<sup>2</sup>.

S'estima que la incidència de MSC en adults als Estats Units varia entre 180.000 a 450.000 a l'any<sup>1,2</sup>. A Europa, la incidència és similar a la dels Estats Units<sup>3</sup>. La variabilitat ve donada majoritàriament pels criteris d'inclusió (com el temps des del primer símptoma, la inclusió de les MSC sense testimonis, o la inclusió de les MSC avortades) i el tipus d'anàlisi (retrospectiu amb els certificats mèdics, o prospectiu)<sup>2,4</sup>.

## **1.2. Substrats de la mort sobtada cardíaca**

### **1.2.1. Mort sobtada cardíaca en l'adult**

Pel desenvolupament de la MSC és necessari un substrat (la malaltia) i un desencadenant, com l'exercici físic o estrès emocional, que provoqui una inestabilitat cardíaca que desencadeni l'arítmia fatal<sup>5</sup>.

La causa més comuna associada a la MSC en adults (75-80%) és la malaltia coronària. Un 10-15% de les MSC són degudes a cardiomiopaties com la cardiomiopatia hipertròfica, la cardiomiopatia dilatada, la displàsia aritmogènica de ventricle dret i anomalies congènites (especialment anomalies de l'artèria coronària). Finalment, el 5-10% restant de MSC són a causa d'una anomalia elèctrica sense defecte estructural del cor.

Les malalties elèctriques cardíaques que formen part d'aquest últim grup, són per definició malalties rares i hereditàries, i en molts casos la MSC és el primer símptoma de la malaltia. Aquestes són: la SQTL, la SBr, la

Síndrome del QT curt (SQTC), la Fibril·lació Auricular Familiar (FAF), la Síndrome de Lev-Lenègre (o Síndrome Progressiva del Sistema de Conducció Cardíaca, SPCC) i la Taquicàrdia Ventricular Polimòrfica Catecolaminèrgica (TVPC)<sup>1-3</sup>.

Tot i l'ampli espectre de malalties que poden desenvolupar una MSC, la causa de la MSC en un 75-80% dels casos, és una fibril·lació ventricular (FV); i en el 15-20% dels casos és per una bradiarítmia<sup>1,2</sup>.

### **1.2.2. Mort sobtada del lactant, infants i adolescents**

Les morts sobtades d'infants de més d'un any i joves adolescents representen un 10% de les morts en etapa pediàtrica, que representa entre un i cinc nens/joves cada 100.000 per any. Tot i que en articles recents s'observa que una tercera part d'aquestes morts segueix com inexplicada, després de l'autòpsia, la major part d'aquestes morts es poden atribuir a malalties cardíaques com les de l'individu adult: hereditàries com cardiomiopatia dilatada, cardiomiopatia hipertròfica, i canalopaties (SBr, SQTL, CPVT, i FAF), defectes cardíacs congènits; anomalies de l'aorta; o miocarditis<sup>6,7</sup>.

El contrari que en els infants més grans, la mort sobtada en els infants menors d'un any representa un 70-80% de les morts en etapes lactants, la major part abans dels 6 mesos de vida. La MSL és la primera causa de mortalitat en nadons de menys d'un any en països industrialitzats<sup>8</sup>, i és una mort definida per exclusió. Es defineix la MSL com la mort d'un nadó amb menys d'un any de vida per causes desconegudes (després de

l'autòpsia, l'examen de l'escena i la revisió dels antecedents clínics del nadó i la família)<sup>8</sup>. Els substrats de la MSL poden ser diversos, es considera una mort multifactorial en la qual han de coincidir diversos factors: vulnerabilitat de l'infant (prematuro i infeccions), factors de risc ambientals i genètics, anomalies bioquímiques, i un factor supressor extern (com dormir en una posició propensa)<sup>8,9</sup>. Actualment se sap que un 10-20% dels casos de MSL estan causats pels mateixos gens que codifiquen per les proteïnes relacionades amb les síndromes aritmogèniques amb un alt risc de MSC en l'individu adult (com SQTl, SBr, SQTC o TVPC)<sup>8,9</sup>.

Per tant, es pot observar com les malalties elèctriques cardíaques tenen un paper important en el desencadenament de la MSC en adults, joves i infants. En el següent capítol, s'introduiran les bases de la funció elèctrica cardíaca, fonamentals per entendre les bases de les malalties elèctriques cardíaques, altrament anomenades canalopaties cardíaques.

## 2. Activitat elèctrica cardíaca

L'activitat elèctrica del cor s'inicia per una excitació del nòdul sinoauricular (NSA) (format per les anomenades cèl·lules automàtiques marcapassos) de l'aurícula dreta. L'ona d'excitació del NSA despolaritza els miòcits auriculars adjacents amb la subseqüent excitació de les aurícules i la seva contracció. Després, aquesta ona es propaga via el nòdul atrioventricular (NAV), el feix de His i les fibres de *purkinje* dels ventricles (en turquesa a la Figura 1A), fins als miòcits cardíacs, despolaritzant-los i provocant la contracció ventricular (Figura 1A).

A les cèl·lules excitable, com les neurones, miòcits o cardiomiòcits, aquest impuls elèctric és possible gràcies al gradient electroquímic que es crea a través de la membrana plasmàtica i a unes proteïnes transmembranals dependents de voltatge que fan possible que els ions hi flueixin a través. Aquestes proteïnes s'anomenen **canals iònics**. Aquests són selectius pels diferents ions, de manera que els canals de sodi ( $\text{Na}^+$ ), calci ( $\text{Ca}^{+2}$ ) i potassi ( $\text{K}^+$ ) dependents de voltatge, que es troben a la membrana dels cardiomiòcits, permeten que els corrents iònics respectius passin per una via independent una de l'altra (Figura 1B).

En el cor en repòs, la diferència de potencial de les membranes dels cardiomiòcits és negatiu, vora uns -90 mil·livolts (mV), és a dir, l'interior dels cardiomiòcits és 90mV més negatiu que l'exterior. Breument, durant l'excitació cardíaca, la membrana es fa permeable als ions de  $\text{Na}^+$ , que

entren dins els cardiomiòcits i fan que el potencial electroquímic es reverteixi cap a potencials més positius. Aquest procés s'anomena despolarització. En conseqüència a la despolarització, per una banda els ions de  $\text{Ca}^{+2}$  entren a dins la cèl·lula, i activen el receptor de la rianodina que permetrà l'alliberament de quantitats massives de  $\text{Ca}^{+2}$  del reticle sarcoplasmàtic (o endoplasmàtic, RE) per activar la maquinària contràctil, per l'altra, s'inicia una repolarització en la qual la cèl·lula recupera progressivament la seva negativitat interna i tornarà al seu estat de repòs. En el transcurs de la repolarització, la membrana cel·lular és selectivament permeable als ions de  $\text{K}^{+}$ , que surten de la cèl·lula, i porten el potencial electroquímic a l'interior cel·lular a més negatiu respecte l'exterior. En aquest moment el cor es relaxa, s'emplena de sang i torna a començar el cicle<sup>10-12</sup>.

## 2.1. Potencial d'acció cardíac

L'excitabilitat cardíaca depèn, doncs, d'un balanç de corrents de despolarització i repolarització. La direcció dels corrents ve determinat pel gradient electroquímic de l'ió corresponent. Per convenció, l'entrada d'un ió positiu cap a l'interior de la cèl·lula s'anomena corrent entrant (com el  $\text{Na}^{+}$  o el  $\text{Ca}^{+2}$ ), i la sortida d'un ió positiu cap a l'exterior de la cèl·lula s'anomena corrent de sortida (com el corrent de  $\text{K}^{+}$ ).

L'impuls elèctric generat per l'intercanvi iònic en les cèl·lules excitable s'utilitza com a via de senyalització, la qual cosa produeix un senyal elèctric que correspon a un balanç dels corrents iònics anomenat

*Potencial d'Acció* (PA) o *Potencial d'Acció Cardíac* (PAC) en els cardiomiòcits. Aquest senyal viatja des de les cèl·lules automàtiques del NSA i el NSV, que l'inicien, fins als cardiomiòcits auriculars i ventriculars. La forma típica del PAC ventricular es pot dividir en 5 fases, que tal hi com s'ha introduït, responen a la activació de canals que provoquen els corrents de  $\text{Na}^+$  ( $I_{\text{Na}}$ ),  $\text{Ca}^{+2}$  ( $I_{\text{Ca}}$ ) i  $\text{K}^+$  ( $I_{\text{to}}$ ,  $I_{\text{K}}$  i  $I_{\text{K1}}$ )<sup>10-13</sup>:

**Fase 0 o fase de despolarització:** s'inicia per una obertura ràpida (o activació) dels canals de  $\text{Na}^+$ . L'entrada de  $I_{\text{Na}}$  a dins la cèl·lula fa que la membrana es despolaritzi i passi d'una diferència de potencial de -90mV a +40mV.

**Fase 1 o repolarització parcial de la membrana:** aquesta fase succeeix immediatament després del pic de despolarització. Aquesta repolarització subtil respon a la inactivació dels canals de  $\text{Na}^+$  i l'obertura dels canals de  $\text{K}^+$  responsables del corrent transitori de sortida de  $\text{K}^+$ ,  $I_{\text{to}}$ .

**Fase 2 o fase *plateau*:** aquesta fase correspon a l'entrada del corrent  $I_{\text{Ca}}$  pels canals de  $\text{Ca}^{+2}$  tipus L ( $I_{\text{CaL}}$ ). L'entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  activa els receptors de la rianodina i allibera el  $\text{Ca}^{+2}$  del RE al citoplasma que propicia la contracció dels cardiomiòcits. Pren importància en aquesta fase l'intercanviador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ , ja que l'augment de  $\text{Ca}^{+2}$  citosòlic activa l'alliberació de  $\text{Ca}^{+2}$  fora la cèl·lula a través de l'intercanviador, fent entrar 3 ions  $\text{Na}^+$  per cada ió  $\text{Ca}^{+2}$  que surt, produint un corrent entrant. En aquesta fase també succeeix una activació gradual de diferents canals de  $\text{K}^+$  dependents de voltatge que condueixen el corrent rectificador

sortint  $I_K$ . En els cardiomiòcits ventriculars, el corrent  $I_K$  està format per dos components: el corrent ràpid ( $I_{Kr}$ ) i el lent ( $I_{Ks}$ ). En aquest punt el PAC està retornant poc a poc a la seva línia basal.

**Fase 3 o fase de repolarització cel·lular:** el final de la fase 2 i la fase 3 correspon a l'efecte de diferents corrents sortints de  $K^+$ :

La suma dels corrents  $I_{Kr}$  i  $I_{Ks}$ , que provoquen l'acabament de la fase *plateau* i el començament la repolarització; i altres corrents de  $K^+$  com el corrent rectificador  $I_K$  tardà ( $I_{Kp}$ ) i el corrent rectificador  $I_{K1}$  també col·laboren en aquesta fase de repolarització.

**Fase 4 o fase de repòs:** en aquesta fase els cardiomiòcits es mantenen estables a un potencial negatiu d'uns -90mV. Aquesta estabilitat es manté per l'efecte del corrent rectificador entrant  $I_{K1}$ . El corrent  $I_{K1}$  equilibra la repolarització, i dóna les condicions necessàries per entrar i mantenir-se a la fase de repòs<sup>11,13</sup>.

A la figura 1C es poden observar diferències en la forma dels PAC dels cardiomiòcits auriculars i ventriculars, i del NSA i NSV. Aquestes divergències són causades, principalment, per la diferència en d'expressió d'alguns canals. Per exemple, el corrent rectificador de  $K^+$  ultraràpid ( $I_{Kur}$ ), només s'expressa en els cardiomiòcits auriculars, i fa que la repolarització sigui més ràpida que en els ventriculars.

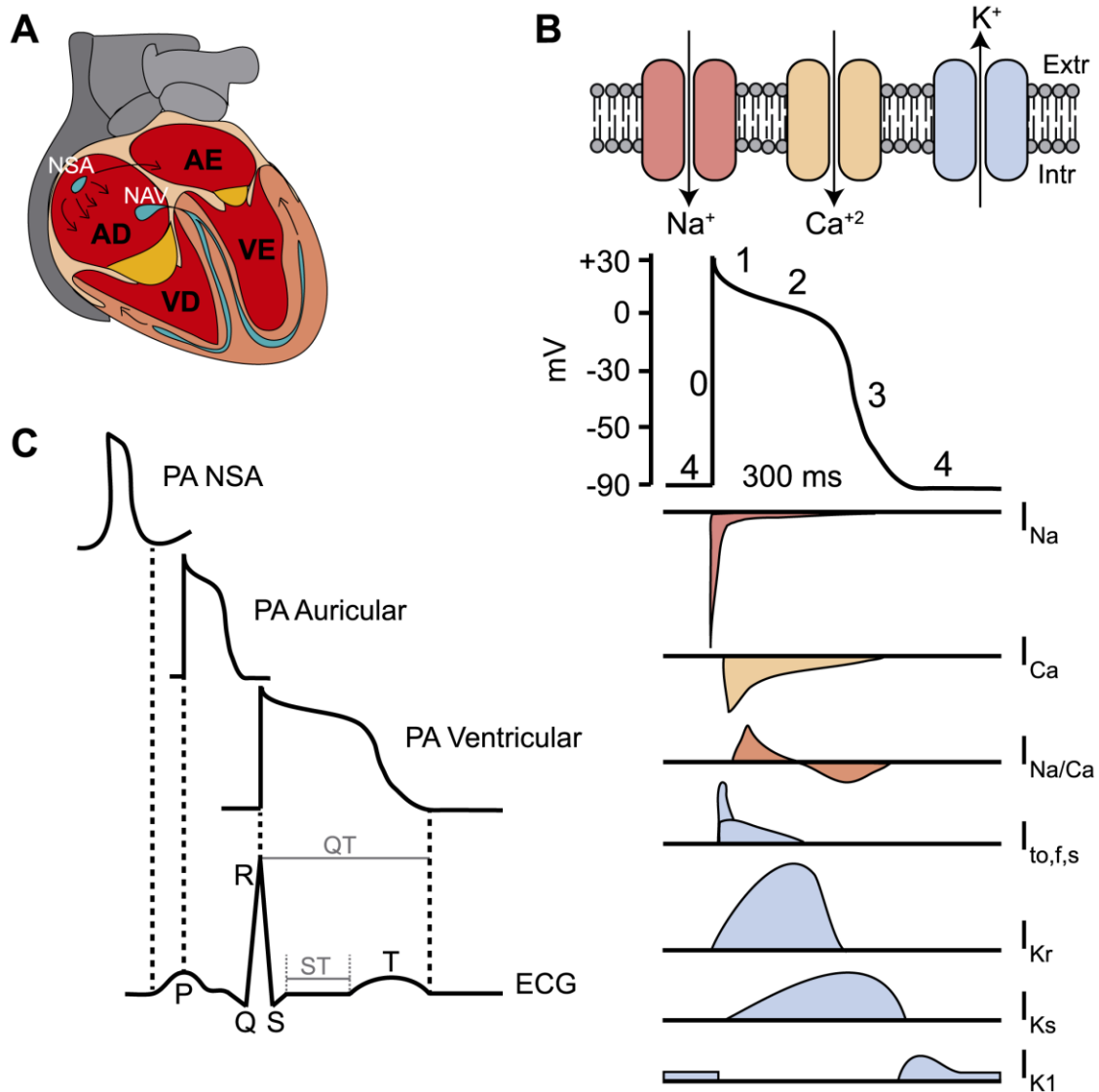
Les diferències en la forma dels PAC dels cardiomiòcits del NSA i NAV respecte dels cardiomiòcits auriculars i ventriculars, són degudes principalment al fet en les cèl·lules nodals no s'expressen els canals que



generen el corrent  $I_{K1}$ , però en canvi s'expressen els canals responsables de l'anomenat corrent marcapassos o *funny current* ( $I_f$ ) a la fase 4. Els canals responsables del corrent  $I_f$ , són permeables al  $Na^+$  i al  $K^+$ , i no permeten que la fase 4 es mantingui en repòs, sinó que es va despolaritzant lentament. A més, els canals responsables de la despolarització són els canals de  $Ca^{+2}$  tipus L i T ( $I_{CaL}$  i  $I_{CaT}$ ), és per aquesta raó que la fase *plateau* és més curta, i el PAC d'aquests cardiomiòcits és més ràpid<sup>11</sup>.

## 2.2. Electrocardiograma

L'electrocardiograma (ECG) és el senyal resultant de la suma dels canvis elèctrics que succeeixen en les diferents regions del cor (Figura 1C). L'ona P correspon a la despolarització del les aurícules; el segment QRS, a la despolarització dels cardiomiòcits ventriculars (fase 0); l'ona T, a la repolarització dels ventricles (fase 1, 2 i 3 del PAC ventricular); i la línia basal correspon a la relaxació dels ventricles (fase 4 del PAC ventricular). La repolarització de les aurícules queda amagada per la despolarització dels ventricles. La durada entre el complex QRS i la ona T s'utilitza per calcular el temps que dura la despolarització-repolarització ventricular, aquest segment és el que s'anomena interval QT; el segment ST comença a on s'acaba el complex QRS (punt J) fins a l'inici de l'ona T<sup>10,11</sup>.



**Figura 1. Activitat elèctrica cardíaca i els corrents iònics del cor.** **A.** Representació esquemàtica del cor: NSA Node Sinoauricular; NAV Node Auriculoventricular; i feix de His i fibres de *purkinje* (en turquesa); A aurícula; V ventricle; E esquerra; i D dret. **B.** Representació del PAC típic d'un miòcit ventricular generat pels corrents entrants i sortints dels ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  i  $\text{K}^+$  a través dels corresponents canals iònics dependents de voltatge. El corrent de  $\text{Na}^+$  ( $I_{\text{Na}}$ ) està representat en vermell, el corrent de  $\text{Ca}^{+2}$  ( $I_{\text{CaL}}$ ) en taronja, corrent  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$  corresponent al corrent generat per l'intercanviador Na/Ca en taronja fosc ( $I_{\text{Na/Ca}}$ ), i els diferents corrents de  $\text{K}^+$  en blau ( $I_{\text{K}}$ ). **C.** Correlació entre els diferents potencials d'acció (PA) a les diferents regions de cor i l'electrocardiograma (ECG).

### 2.3. Malalties elèctriques o canalopaties cardíques

Com s'ha pogut observar en els apartats anteriors, el correcte funcionament del cor requereix una funció orquestrada dels corrents d'entrada i sortida a través dels diferents canals iònics dependents de voltatge que es troben a la membrana plasmàtica dels cardiomiòcits.

Alteracions, encara que petites, en els nivells d'expressió i/o en les propietats biofísiques dels diferents canals iònics, afecten l'heterogeneïtat dels corrents en les diferents regions del cor<sup>10,11</sup>. Una alteració en el comportament d'aquests canals pot provocar una alteració en el flux del corrent provocant, per exemple, una repolarització anormal que provoqui una FV, desencadenant principal del MSC en les malalties elèctriques cardíques, anomenades **canalopaties cardíques**.

Una de les principals causes de les alteracions d'aquests canals iònics són les mutacions patogèniques als gens que codifiquen per les proteïnes que formen els canals. Aquestes mutacions poden ser tant a mateixa subunitat  $\alpha$  (que forma el porus per on passen els ions corresponents, Taula 1), com en les corresponents subunitats  $\beta$ , com en altres proteïnes reguladores que impedeixin obtenir un canal funcional a la membrana plasmàtica. Les mutacions poden provocar alteracions en l'estructura de la proteïna que forma el canal, que donen lloc a alteracions de la funció, localització, regulació i/o modulació d'aquests que poden ser la causa de diferents de defectes en el ECG i desencadenar arítmies amb alt risc de MSC<sup>11</sup>.

Actualment, la diagnosi genètica de les canalopaties cardíques no es realitza de rutina, tot i això, les directius publicades recomanen la diagnosi genètica per propòsits clínics<sup>2,5,14</sup>. L'ECG, l'anàlisi genètica i la informació familiar són les eines utilitzades per identificar i predir la severitat de les malalties elèctriques hereditàries, tant en SQTL com en la SBr<sup>2,5,14</sup>.

Tot i que l'ús de la informació genètica en les decisions clíniques ha assolit un nivell de complexitat molt elevat, està permetent desxifrar associacions de les malalties aritmogèniques amb els gens i viceversa. Tenint en compte que la interpretació d'un test genètic i la causalitat d'una mutació es descriu en termes probabilístics i no determinístics<sup>15-17</sup>, la importància clínica de trobar la mutació causal recau en tres fets: (1) Donar suport el diagnòstic clínic; (2) Dirigir el tractament; i (3) Identificar els familiars portadors de la mutació que poden estar amb risc de patir una MSC<sup>2,5,14</sup>.

El terme mutació o variant genètica defineix qualsevol canvi de nucleòtid en la seqüència del DNA. Les mutacions trobades poden involucrar un canvi d'un sol nucleòtid (*Single Nucleotide Variant*, SNV) que codifica pel mateix aminoàcid (canvi sinònim), que codifica per un aminoàcid diferent (canvi no sinònim o *missense*), o que codifica per un codó STOP (canvi sense sentit o *nonsense*); poden ser delecions o insercions de més d'una base, que poden provocar un corriment en el marc de lectura (*frameshift*);

o poden ser delecions o insercions grans que involucrin un o diversos exons a la vegada.

No totes les mutacions són patogèniques. Per predir la patogenicitat de les mutacions, s'utilitzen els següents criteris per tal d'avaluar-la<sup>15,18</sup>:

- (1) Cosegregació de la mutació amb la malaltia en un pedigrí multigeneracional.
- (2) Mutació absent o rara en individus sans i en bases de dades de exomes/genomes públics<sup>a</sup>. En termes de freqüència a la població, les mutacions podran ser noves (no descrites prèviament), rares (descrites a <1% de la població), o comunes/polimòrfiques (descrites a > 1% de la població).
- (3) Mutacions radicals (mutacions que introdueixen un codó STOP prematur, o *frameshifts*).
- (4) Estudis funcionals que demostrin una pertorbació fenotípica.
- (5) Predicció *in silico* de la patogenicitat a partir de programes bioinformàtics<sup>b</sup>.

---

<sup>a</sup> Els exomes/genomes públics utilitzats són: Exome Variant Server Exome Variant Server, NHLBI GO Exome Sequencing Project 6.500 (ESP, <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>); 1.000 genomes project (<http://www.1000genomes.org/>); i dbSNP database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>).

<sup>b</sup> Els programes bioinformàtics de predicció de patogenicitat més utilitzats a la literatura són: Polyphen-2, URL: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>; SIFT, Sorting Intolerant from Tolerant, URL: <http://sift.jcvi.org/>32; Condel, CONsensus DELeteriorousness score of non-synonymous single nucleotide variant, URL: <http://bg.upf.edu/condel/home>; i PROVEAN v.1.1, Protein Variation Effect Analyzer, URL: <http://provean.jcvi.org/index.php>.

Des d'un punt de vista de patogenicitat, les mutacions es poden catalogar com a: probablement patogèniques, provoquen un efecte fenotípic patogènic a l'individu portador; probablement benignes o neutrals, el canvi en la seqüència probablement no és el causant de la canalopatia; o variants de significat incert (*Variant with Uncertain Significance, VUS*), quan la suma de les evidències no és suficient per catalogar una mutació com a causal ni com a no causal<sup>5,15</sup>.

A la taula 1 es pot observar com defectes per mutacions en els corrents claus del PAC a les subunitats que formen els respectius canals, poden estar involucrats en les diferents canalopaties, majoritàriament a SBr, SQTL, SQTC, FAF. Els pròxims capítols de la introducció se centraran en les bases clíniques, i genètiques de la SQTL (Capítol 3) i la SBr (Capítol 4) ja que són les dues canalopaties en les quals es basa aquesta tesi.

D'altra banda, les mutacions poden provocar una alteració que suposi tant un guany de funció, com una pèrdua de funció del canal.

A partir del capítol 5, la introducció se centrarà en els conceptes que envolten la electricitat cel·lular, el registre dels corrents, l'estructura i funció dels canals iònics dependents de voltatge (en concret el canal de sodi, Capítol 6) i els mecanismes moleculars pels quals les mutacions als canals iònics cardíacs poden explicar la SQTL i la SBr (Capítol 7).

Corrent	Subunitat $\alpha$	Gen	Canalopatia	Alteració del corrent/canal
$I_{Na}$	$Na_v1.5$	<i>SCN5A</i>	SBr	Pèrdua de funció
			SQTL3 (+SSS)	Guany de funció
			SPCC	Pèrdua de funció
			FAF	Pèrdua i guany de funció
$I_{to,ràpida}$	$K_v4.3$	<i>KCND3</i>	SBr	Guany de funció
$I_{to,lenta}$	$K_v1.4$	<i>KCNA4</i>	-	-
$I_{CaL}$	$Ca_v1.2$	<i>CACNA1C</i>	SBr	Pèrdua de funció
			SQTL (+ST)	Guany de funció
$I_{Kur}$	$K_v1.5$	<i>KCNA5</i>	FAF	Pèrdua de funció
$I_{Kr}$	$K_v11.1$	<i>KCNH2</i>	SQTL2	Pèrdua de funció
			SQTC	Guany de funció
			FAF	Guany de funció
$I_{Ks}$	$K_v7.1$	<i>KCNQ1</i>	SQTL (+SJLN)	Pèrdua de funció
			SQTC	Guany de funció
			FAF	Guany de funció
$I_{K1}$	Kir2.1	<i>KCNJ2</i>	SQTL7 (+SAT)	Pèrdua de funció
			SQTC	Guany de funció
			FAF	Guany de funció
$I_{KAch}$	Kir4.5	<i>KCNJ5</i>	SQTL	Pèrdua de funció
$I_f$	HCN4	<i>HCN4</i>	SSS	Pèrdua de funció
			FAF	Pèrdua de funció
			SBr	Pèrdua de funció

**Taula 1. Bases genètiques i moleculars dels corrents iònics i la seva alteració en les arítmies cardíques hereditàries.** SBr: Síndrome de Brugada; SQTL, Síndrome del QT Llarg; SPCC, Síndrome Progressiva del sistema de Conducció Cardíaca; FAF Fibril·lació Auricular Familiar; SQTC, Síndrome de QT Curt; SSS *Sick Sinus Syndrome*, o Síndrome del Node Sinusal Malalt; ST, Síndrome de Timothy; SJLN, Síndrome de Jervell Lange Nielsen; SAT, Síndrome d'Andersen-Tawil. En aquesta taula només es mostren les subunitats  $\alpha$  dels canals. Les subunitats  $\beta$  i altres proteïnes reguladores d'interès s'aniran nomenant al llarg de la tesi.

### 3. Síndrome del QT llarg

La SQTL es defineix com una malaltia cardiovascular rara (1 cada 2000 individus<sup>19</sup>) caracteritzada per síncope, marejos, *torsades de pointes* (TdP), fibril·lació ventricular, i un alt risc de MSC<sup>20,21</sup>. Aquesta síndrome es diagnostica per una prolongació de l'interval QT en el ECG causada per un retard en la repolarització ventricular sense cap defecte estructural del cor (Figura 2)<sup>22,23</sup>.

La SQTL pot desenvolupar-se a causa de defectes genètics o pot ser adquirida. Fins als començaments dels anys 90 s'atribuïa la SQTL a una activitat dominant del nervi simpàtic dret del cor. Quan es va observar que el tractament amb bloquejadors de canals de K<sup>+</sup> provocava la morfologia típica de SQTL, postdespolaritzacions precoces (*early afterdepolarization*, EAD) i TdP, es va associar que la causa de la SQTL és un defecte als corrents responsables de la repolarització<sup>24</sup>.

Aquesta tesi se centra en la SQTL hereditària. La SQTL per causes genètiques succeeix quan mutacions a les proteïnes que formen o modulen els canals de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> i Ca<sup>+2</sup>, provoquen una repolarització anòmala que prolonga l'interval QT. Fins al moment, s'han descrit mutacions a 16 gens susceptibles de provocar SQTL, i són els 3 primers (*KCNQ1* (SQTL1), *KCNH2* (SQTL2) i *SCN5A* (SQTL3)), els causants de la major part de SQTL<sup>24</sup> (Taula 2).



### 3.1. Fenotip i diagnòstic clínic

#### 3.1.1. Prolongació de l'interval QT

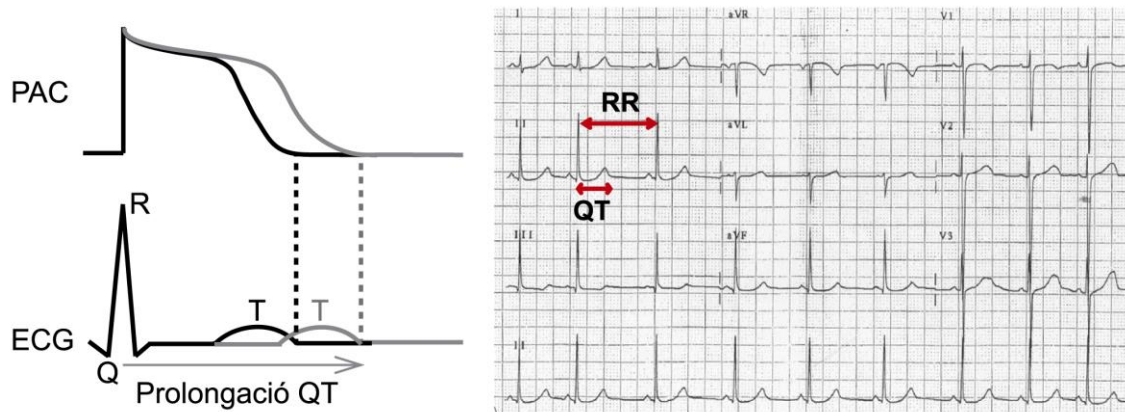
La classificació del tipus de SQTl es numera en funció del gen afectat i per ordre de publicació (Taula 2). Es pot observar que els 16 gens configuren 15 tipus diferents de SQTl. Tot i les diferències del mecanisme pel qual es provoca la SQTl (s'explica a continuació), la característica més important pel diagnòstic dels 15 SQTl és la prolongació de l'interval QT en les 12 derivacions del ECG<sup>24</sup>.

La distància del QT és la distància entre el pic del QRS, que indica la despolarització ventricular, i el final de la ona T, que indica el final de la repolarització ventricular. L'interval RR és la distància entre els pics de dos complexos QRS consecutius, de despolarització a despolarització<sup>25</sup>.

L'interval QT es mesura calculant el QT corregit (QTc) seguint la fórmula de Bazett, on la distància del QT (en mil·lisegons (ms)) es corregeix per l'arrel quadrada de la duració de l'interval RR (en ms):

$$QTc = QT / \sqrt{RR}$$

Es considera QT llarg un QTc igual o major de 460ms en dones, i igual o major de 450 ms en homes<sup>25</sup>, diversos estudis han demostrat que l'interval QT és més llarg en dones joves i de mitjana edat, en comparació amb els homes. Aquesta diferència apareix a l'adolescència per un escurçament de l'interval QT en els nois, segurament a causa d'un efecte de la testosterona<sup>18,25</sup>.



**Figura 2. Comparació del ECG normal o amb QT llarg.** A l'esquerra representació de l'allargament del PAC (gris) en comparació el PAC cardíac normal (negre) que causa l'allargament del QT en l'electrocardiograma. A la dreta un ECG de 12 derivacions d'un pacient amb QT llarg a on s'assenyala l'interval RR i l'interval QT.

Tipus de SQTL	Gen	Proteïna	Efecte funcional	Herència	Incidència	
SQTL majoritaris	SQTL1	<i>KCNQ1</i>	$K_v7.1$	Reducció $I_{Ks}$	AD i AR	30-35%
	SQTL2	<i>KCNH2</i>	$K_v11.1$	Reducció $I_{Kr}$	AD	25-30%
	SQTL3	<i>SCN5A</i>	$Na_v1.5$	Augment $I_{Na}$	AD	5-10%
SQTL minoritaris	SQTL5	<i>KCNE1</i>	Mink	Reducció $I_{Ks}$	AD	<1%
	SQTL6	<i>KCNE2</i>	Mirp1	Reducció $I_{Kr}$	AD	<1%
	SQTL9	<i>CAV3</i>	Caveolina	Augment $I_{Na}$	AD	<1%
	SQTL10	<i>SCN4B</i>	$Na_v\beta4$	Augment $I_{Na}$	AD	<1%
	SQTL11	<i>AKAP9</i>	Yotiao	Reducció $I_{Ks}$	AD	<1%
	SQTL12	<i>SNTA1</i>	$\alpha$ -sintrofina	Augment $I_{Na}$	AD	<1%
	SQTL13	<i>KCNJ5</i>	$Kir3.4$	Reducció $I_{KAch}$	AD	<1%
	SQTL14	<i>RYR2</i>	Receptor de rianodina	Augment $I_{Ca}$	AD	Molt rara
SQTL15	<i>CALM1</i>	Calmodulina 1	múltiples	AD	Molt rara	
	<i>CALM2</i>	Calmodulina 2				
Desordre multisistèmic, SQTL més malignes	SJLN	<i>KCNQ1</i>	$K_v7.1$	Reducció $I_{Ks}$	AR	Molt rara
		<i>KCNE1</i>	Mink	Reducció $I_{Ks}$	AR	Molt rara
	SQTL7 o ATS	<i>KCNJ2</i>	$Kir2.1$	Reducció $I_{K1}$	AD	Molt rara
	SQTL4 o ankyrin-B syndrome	<i>ANKB</i>	Anquirina-B	Alteració en la localització dels canals	AD	Molt rara
	SQTL8 o TS	<i>CACNA1C</i>	$Ca_v1.2$	Augment $I_{CaL}$	AD	Molt rara

**Taula 2. Taula resum dels gens associats a la SQTL.**

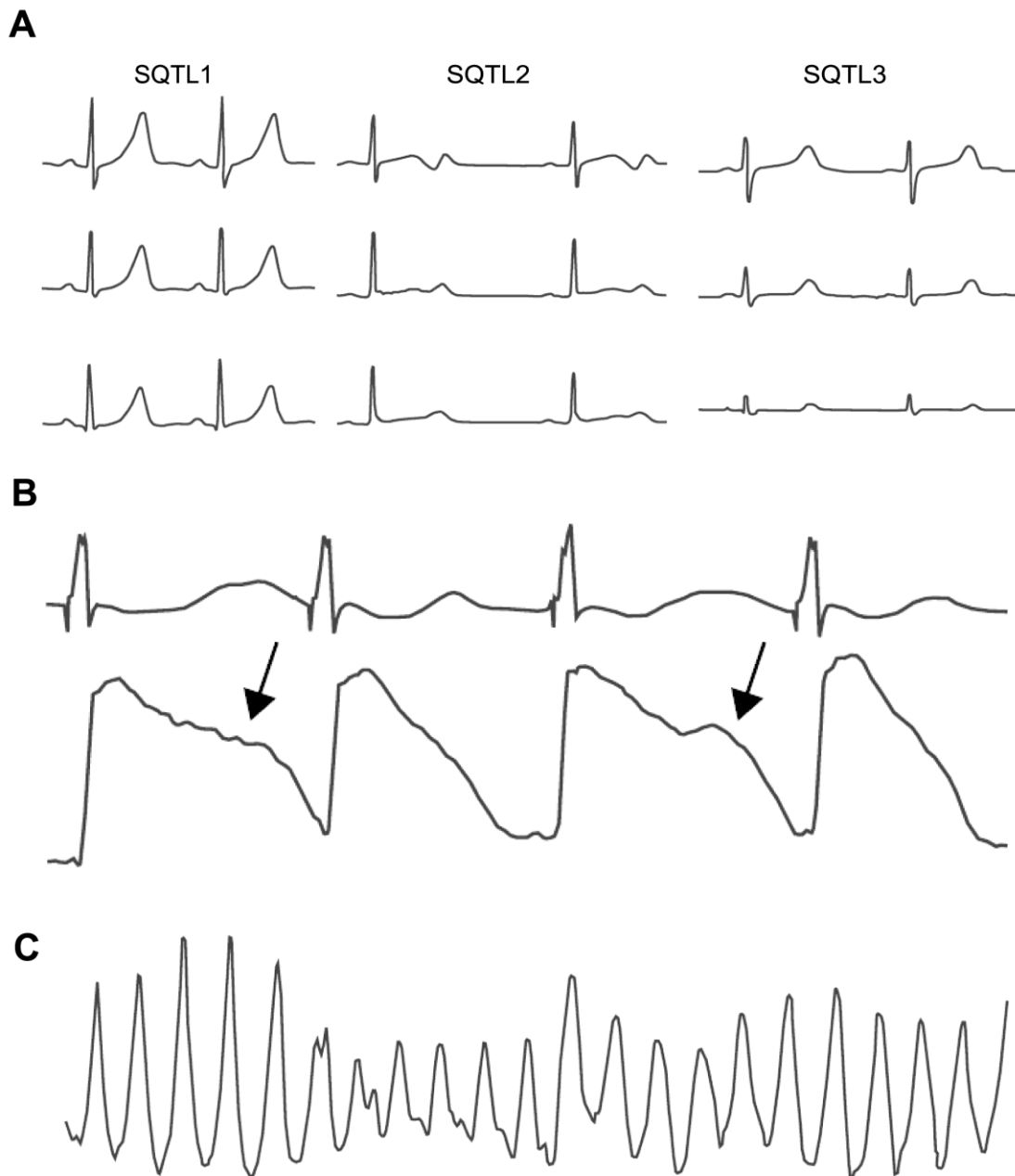
### 3.1.2. Defectes en el ECG determinants de SQT

A part de la prolongació del QT, una alteració a la fase 2 i 3 del PAC pot provocar altres defectes en els ECG dels pacients amb SQT. En aquest apartat es descriuen alguns d'aquests defectes electrocardiogràfics, ja que es nombren al llarg de la tesi i dels articles publicats.

**Dispersió del QT:** quan s'observa una prolongació del QT desigual en les 12 derivacions del ECG s'anomena dispersió del QT. Si en mesurar la diferència entre l'interval QT mínim i màxim de les 12 derivacions, s'observa un increment en la dispersió del QT ( $> 100$  ms), pot suggerir que hi ha àrees cardíaques amb diferents temps de repolarització que poden ser un substrat de FV<sup>24</sup>.

**Morfologia anòmala de l'ona T:** les característiques morfològiques de la ona T, poden donar informació diagnòstica. S'ha observat que una ona de base ampla podria ser causada per un SQT1; una ona de base estreta però amb una osca pronunciada determinaria un SQT2; i una ona T tardana indicaria un SQT3. Un diagnòstic clínic acurat d'aquesta característica permetria una aproximació del corrent afectat abans del diagnòstic genètic<sup>18,24,25</sup> (Figura 3A).

**Ones T alternades:** són causades per una alternació de la duració del PAC entre batec i batec (Figura 3B). Aquestes alternacions en el PAC (llarg-curt-llarg) es produeixen per una alternança en el cicle del  $Ca^{+2}$ , que altera la duració o l'amplitud gradient transmural; i poden provocar també EAD a la fase 3 del PAC ventricular<sup>18,24,25</sup>.



**Figura 3. Imatges representatives d'altres defectes electrocardiogràfics en pacients amb SQTL. A.** Diferències en la ona T entre els pacients de SQTL1, 2 i 3. SQTL1: ona T de base ampla i prolongació del QT ( $QTc=530ms$ ); SQTL2: ona T poc ampla però amb una osca i prolongació del QT ( $QTc=550ms$ ); i SQTL3: prolongació del QT, amb un segment QT pla i una ona T tardana ( $QTc=510ms$ ). **B.** *Early after depolarizations* (EADs) alternades (senyalades amb una fletxa) que provoquen alternança de l'ona T en el ECG. **C.** Representació electrocardiogràfica d'una *torsade de pointes* (TdP). Font: Morita (2008)<sup>24</sup>.

**Bradicàrdia:** una disminució del ritme cardíac s'associa a alguns genotips de SQT (SQT2, SQT3, SQT4, SQT8 i SQT9). La bradicàrdia severa també s'associa a infants amb SQT1<sup>24</sup>.

**TdP i taquicàrdia ventricular polimòrfica:** la TdP és una taquicàrdia ventricular polimòrfica amb la característica de canviar batec a batec, torçant-se al voltant de la línia basal (Figura 3C).

Tot i que normalment les TdP duren segons, si succeeixen repetidament o prolongadament poden provocar un síncope, i poden degenerar a FV amb una alt risc de MSC.

Les EAD acostumen a desenvolupar TdP quan en la fase 2 o 3 del PAC hi ha una despolarització anòmala, per un augment del corrent  $I_{Ca}$  durant la fase 2, o bé per un augment de  $I_{Na}$  durant la fase 3, que trenca el curs normal de la repolarització. La dispersió del QT també pot contribuir en la formació de TdP<sup>24</sup>.

### 3.1.3. Criteris en la diagnosi clínica

La diagnosi de la SQT es basa en la història clínica del pacient (episodis sincopals, episodis amb arítmies letals, la prolongació del QTc) i els antecedents familiars. El sistema més utilitzat en la pràctica clínica per predir el risc de patir SQT, és la taula de puntuació Schwartz publicada el 1993<sup>20</sup> i recentment modificada el 2012<sup>26</sup> (Taula 3).

L'ús d'aquestes taules clarifica aquells casos en què la prolongació del QTc és al límit entre QT llarg o normal, o en els que hi ha símptomes i/o antecedents familiars però el QTc es manté normal.

Una puntuació de  $\geq 3,5$  punts indica una alta probabilitat de patir SQTL (en la taula versió anterior era  $\geq 4$  punts); entre 1,5 i 3 una probabilitat intermèdia; i una puntuació  $\leq 1$  significa baixa probabilitat de patir SQTL<sup>20,26,27</sup>.

		Punts
<b>Troballes electrocardiogràfiques*</b>		
QTc	$\geq 480$ ms	3
	460-470 ms	2
	450 ms (en homes)	1
QTc $\geq 480$ ms, en el quart minut de recuperació prova d'esforç		1
Torsades de pointes‡		2
Alternança de l'ona T		1
Osques a ones T en 3 derivacions		1
Bradycàrdia segons l'edat§		0,5
<b>Història clínica</b>		
Síncopes‡	Amb estrès	2
	Sense estrès	1
Sordesa congènita		0,5
<b>Història familiar¶</b>		
Familiars diagnosticats amb SQTL		1
Mort sobtada inexplicada en un familiar directe menor de 30 anys		0,5

**Taula 3. Criteris diagnòstics de Schwartz<sup>20,26</sup>.** \*Sense medicació o altres desordres que ja afecten l'ECG. ‡ TdP i Síncopes s'exclouen mútuament. § Per sota del segon percentil d'edat. ¶ Un mateix pacient no es pot contar dues vegades.

## 3.2. Implicacions diagnòstiques de l'anàlisi genètica en SQTL

### 3.2.1. Gens i mecanismes associats a SQTL

A l'inici, la SQTL hereditària es va definir amb dos tipus d'herència:

- (1) la Síndrome Romano-Ward, la més comuna, que s'hereta a través d'un patró autosòmic dominant amb penetrància incompleta<sup>28</sup>;
- (2) la Síndrome de Jervell and Lange-Nielsen (SJLN), que es caracteritza per la presència de sordesa familiar i s'hereta de manera autosòmica recessiva<sup>29</sup>.

Una forma més actualitzada d'anomenar la SQTL hereditària és en funció del gen afectat i per ordre de publicació (Taula 2). Com s'ha dit anteriorment, són 16 els gens associats a SQTL:

(a) Gens que codifiquen per subunitats del diversos canals de potassi:

*KCNQ1* (SQTL1), *KCNH2* (SQTL2), *KCNE1* (SQTL5), *KCNE2* (SQTL6), *KCNJ2* (SQTL7), i *KCNJ5* (SQTL13);

(b) Gens que codifiquen per subunitats que formen el canal de sodi cardíac: *SCN5A* (SQTL3), i *SCN4B* (SQTL10);

(c) Gens que codifiquen per diferents subunitats de canals de calci: *CACNA1C* (SQTL8), i *RYR2* (SQTL14);

(d) Gens que codifiquen per proteïnes que interaccionen amb els canals iònics cardíacs: *ANK2* (SQTL4), *AKAP9* (SQTL11), *CAV3* (SQTL9), *SNTA1* (SQTL12), *CALM1* i *CALM2* (SQTL15).

Per tant, la prolongació del QT pot ser a causa d'alteracions a les diferents proteïnes que configuren o regulen els canals de potassi, calci o sodi. Des d'un punt de vista del mecanisme, la prolongació de l'interval QT és a causa d'una pèrdua de funció dels corrents responsables de la repolarització del PAC o d'un augment dels corrents despolaritzants.

És a dir, les mutacions patogèniques a les proteïnes que codifiquen pels diferents corrents de potassi —com  $I_{Ks}$  (alteracions en el  $K_v7.1$  o proteïnes moduladores),  $I_{Kr}$  (alteracions en el  $K_v11.1$  o proteïnes moduladores),  $I_{K1}$  (alteracions  $Kir2.1$  o proteïnes reguladores), o a  $I_{KAch}$

(alteracions a Kir3.4, o proteïnes reguladores)— provoquen una pèrdua de funció d'aquests que causa una repolarització més lenta.

En canvi, les mutacions al canal de sodi cardíac ( $\text{Na}_v1.5$  o proteïnes reguladores), o al canal de calci tipus L ( $\text{Ca}_v1.2$  o proteïnes reguladores), provoquen un increment dels corrents  $I_{\text{Na}}$ ,  $I_{\text{CaL}}$  tardans durant les fases 2-3 del PAC, que en conseqüència alenteix també la repolarització<sup>11,23,24</sup>.

Les SQTL1, 2 i 3 són les tres formes majoritàries de la malaltia associades a mutacions a  $\text{K}_v7.1$  que provoquen una pèrdua de funció de  $I_{\text{Ks}}$ <sup>30</sup>, a  $\text{K}_v11.1$  responsables d'una pèrdua de funció de  $I_{\text{Kr}}$ <sup>31</sup>, i a  $\text{Na}_v1.5$  responsables d'un increment de la funció de  $I_{\text{Na}}$ <sup>32,33</sup>, respectivament. Mutacions als 3 gens respectius, juntament amb els gens que codifiquen les subunitat  $\beta$  del  $\text{K}_v7.1$  i  $\text{K}_v11.1$  — *KCNE1* (Mink, SQTL5)<sup>34</sup> i *KCNE2* (Mirp1, SQTL6)<sup>35</sup> respectivament — són les responsables del 60-75% dels casos de SQTL (Taula 2)<sup>18,36-41</sup>.

Majoritàriament totes les mutacions són d'herència autosòmica dominant, menys algunes mutacions de *KCNQ1* i *KCNE1* que s'hereten de manera autosòmica i provoquen SJLN. Aquesta síndrome és més severa clínicament, i s'engloba juntament amb les tres formes que es llisten a continuació, amb les formes més malignes de SQTL relacionades a desordres multisistèmics (Taula 2)<sup>18</sup>:

(1) La pèrdua de funció de l'anquirina-B per mutacions al gen *ANK2* causa un desordre anomenat Síndrome de l'anquirina-B que provoca alteracions del node sinusal, FV idiopàtiques, CPVT, i QT llarg.



(2) Les mutacions al *KCNJ2* són responsables del desordre anomenat síndrome d'Anderson-Tawil (SAT), que es caracteritza per paràlisi periòdica, arítmies cardíques, i trets dismòrfics. En comparació amb les formes clàssiques de SQTL l'alteració en el ECG es caracteritza per una lleu prolongació del QTc però amb unes ones U molt àmplies.

(3) Les mutacions al gen *CACNA1C* associades a la Síndrome de Timothy (ST)<sup>18</sup>, que també es caracteritza per defectes neurològics i de desenvolupament, a part de QT llarg i arítmies cardíques.

Tot i que en els tres casos els primers indicis evidenciaven que un augment del QTc era un símptoma més d'aquestes malalties multisistèmiques, més recentment s'han identificat mutacions a *ANK2*, *KCNJ2*, i *CACNA1C* associades només a SQTL sense evidències dels símptomes típics de SSS, SAT, o ST, respectivament<sup>42-44</sup>.

### **3.2.2. Criteris de diagnosi genètica en els pacients amb SQTL**

Les guies/directius publicades per establir criteris i recomanacions de la diagnosi genètica per propòsits clínics, recomanen l'anàlisi genètica dels gens *KCNQ1*, *KCNH2*, i *SCN5A* en els pacients amb SQTL (juntament amb *KCNE1* i *KCNE2* en algunes guies<sup>14</sup>. L'anàlisi d'aquests gens pot significar la identificació de pacients amb mutació al voltant d'un 60-75% dels pacients amb SQTL diagnosticada clínicament<sup>5,14</sup>.

El ràpid avenç de les noves tecnologies i la recent publicació d'exomes complets de més de 6.500 individus de població general – NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP) – posa de manifest que algunes de les

mutacions trobades en els gens majoritaris i minoritaris que es troben en una freqüència alta en població general poden ser falsos positius<sup>45</sup>. És per aquest motiu, que la diagnosi genètica de la resta de gens minoritaris (que representen 5-10%) de moment no està recomanada de rutina per diagnòstic ja que podria augmentar el número de falsos positius<sup>5</sup>.

D'altra banda, la diagnosi genètica a pacients amb clíniques poc robustes, o com a part de rastrejos preesportius o similars, tampoc està recomanada ja que podria augmentar la prevalença de VUS i complicar l'assignació d'un fenotip en funció del genotip si no hi ha una base clínica que la suporta<sup>5</sup>. Només es recomana la diagnosi genètica de familiars sense una diagnosi clínica per identificar els familiars portadors i establir la segregació familiar<sup>5,14</sup>.

### **3.2.3. Penetrància incompleta i expressivitat variable**

Tenint en compte els diversos estudis relacionats amb les mutacions en els diferents genotips de SQT1, es pot observar com aproximadament un 40% de les famílies tenen penetrància incompleta.

D'altra banda, també s'ha observat que dins d'una mateixa família, hi ha un espectre molt ampli en les manifestacions fenotípiques que pot variar des de mantenir-se asimptomàtic la major part de la vida, a patir esdeveniments arítmics ja des de la infantesa<sup>16,18,46</sup>. Aquesta variabilitat, en part, es pot explicar per factors de l'individu, factors exògens i per modificadors genètics<sup>16,18,47</sup>. A continuació s'exposen alguns d'aquests mecanismes:

Com s'ha dit anteriorment, hi ha una diferència en la prolongació del QTc marcada pel sexe, ja que les dones tendeixen a tenir un QT més llarg que els homes<sup>18</sup>.

D'altra banda, factors exògens com un desequilibri electrolític com la hipocalèmia, febre o la presència de bloquejadors de potassi també poden afectar a la llargada del QT<sup>16,47</sup>.

Recentment s'han estudiat els factors genètics que podrien estar modulant una mutació patogènica i que podrien explicar la diferència en fenotip a diferents membres d'una mateixa família: (1) l'acció de variants genètiques comunes que podrien modular l'efecte de les mutacions causals de SQT1, SQT2 i SQT3, com per exemple *KCNE1* p.(Asp85Asn), *KCNE2* p.(Lys897Thr) i *SCN5A* p.(His558Arg), respectivament; (2) mutacions a regions no codificants però crítiques per la regulació de l'expressió, com promotors, UTR 3' o 5'; i (3) l'acció de variants comunes a gens no relacionats amb el SQT però que la seva modulació podria modificar el fenotip, per exemple, variants comunes en els receptors  $\alpha$  o  $\beta$  adrenèrgics que podrien modular la severitat del SQT1<sup>18,47</sup>.

### **3.3. Relació genotip-fenotip i estratificació del risc**

Per tal d'avaluar l'estratificació del risc i la decisió del procés clínic, en aquest moment s'utilitzen tant les característiques fenotípiques (QTc, símptomes, història familiar, sexe, edat) com les genotípiques (gen afectat). Seguidament es planteja una possible estratificació del risc

proposat per Giudicessi i Ackerman (2013)<sup>18</sup> — basant-se en els articles Priori (2003), Sauer (2007), Westenskow (2004) i Mullally (2013)<sup>48-51</sup> — tot i que hi ha publicades altres estratificacions similars<sup>23</sup>:

(1) Els pacients amb un risc molt alt ( $\geq 80\%$ ) de patir una o més arítmies cardíques o MSC abans dels 40 anys són aquells amb: mutacions causals a més d'un al·lel del *KCNQ1* amb herència autosòmica recessiva (SJLN) i que han tingut  $\geq$  de 10 esdeveniments cardíacs abans dels 18 anys; o el pacients amb ST. En aquests casos, és necessari un procés clínic més agressiu que normalment requereix la implantació d'un DAI.

(2) Els pacients que tenen un risc alt ( $\geq 50\%$ ) de patir una arítmia cardíaca deguda a la SQTl abans dels 40 anys, són aquells amb: un QTc  $\geq 550$ ms, independentment del genotip; un QTc  $\geq 500$  ms en pacients amb SQTl1, SQTl2 o homes amb SQTl3; pacients amb més d'un al·lel afectat sigui per dues mutacions patogèniques heterozigotes al mateix gen (compostes) o dues mutacions patogèniques heterozigotes a gens diferents (digèniques); i els pacients amb més de 2 (però menys de 10) arítmies cardíques abans dels 18 anys.

(3) Els pacients que es troben en un risc intermedi (30-49%) de tornar a patir una arítmia cardíaca són: pacients amb un QTc entre 500 i 549 ms, independentment del fenotip; dones amb genotip associat a SQTl1, 2 o 3; homes amb SQTl3 amb un QTc  $< 500$  ms; o qualsevol pacient que hagi patit menys de 2 esdeveniments cardíacs associats al SQTl abans dels 40 anys. El tractament, normalment és amb  $\beta$ -bloquejadors.

(4) Tots els altres pacients amb SQTL, però que s'hagin mantingut asimptomàtics amb un QTc < 500 ms, tenen un risc relativament baix de patir un esdeveniment arítmic (< 30%) i el tractament s'hauria de valorar en funció del cas.

D'altra banda, s'ha demostrat també una diferència en la causa que desenvolupa l'esdeveniment arítmic en funció del genotip. El 2001 sobre una població de 670 pacients simptomàtics amb SQTL, es va dividir la causa sota la qual s'havia produït l'arítmia o la MSC en tres grups: exercici, emoció o repòs. Més endavant el 2012, els resultats obtinguts es van modificar pel mateix autor amb noves evidències<sup>26</sup>. En aquests articles descriuen que:

Majoritàriament els pacients amb SQTL1 desenvolupen les arítmies en exercici (75%), mentre que esdeveniments arítmics sota estrès emocional o en repòs són més rars (15 i 10%, respectivament); els pacients amb SQTL2, desenvolupen la major part d'arítmies davant d'un estrès sobtat quan es troben, per exemple el so d'una alarma (63%), seguit per arítmies desenvolupades sota estrès emocional (37%); i finalment, pacients amb SQTL3, el 80% dels desenvolupen l'arítmia en repòs o dormint, un 15% durant un estrès emocional i un 5% en exercici.

En el mateix estudi també es va observar que el 99% dels pacients que havien desenvolupat l'arítmia mentre nedaven eren casos de SQTL1, i que el 80% dels pacients que havien desencadenat l'arítmia sota un soroll sobtat eren casos de SQTL2<sup>27</sup>.

### **3.4. Implicacions terapèutiques de l'anàlisi genètica**

Des del 1970, els antagonistes del receptor  $\beta$ -adrenèrgic ( $\beta$ -bloquejadors) s'utilitzen com a teràpia per a la prevenció dels esdeveniments arítmics letals de la SQTL. Tot i que no està en dubte la seva eficàcia en la reducció de les arítmies cardíques en els pacients amb SQTL, els estudis demostren que els efectes són diferents en funció del genotip. Els  $\beta$ -bloquejadors són molt efectius en els pacients amb SQTL1. Els pacients amb SQTL2, comparats amb el SQTL1, són més susceptibles a tenir un esdeveniment cardíac sobretot quan hi ha un desequilibri en la concentració plasmàtica de potassi, esdeveniments sobtats o en el postpart.

Per tant, en els pacients de SQTL2 el consell clínic i el seguiment durant el tractament és molt important. Finalment, està descrit que el 10-15% dels pacients SQTL3 tractats amb  $\beta$ -bloquejadors tenen esdeveniments cardíacs relacionats amb el corrent de sodi tardà que es manté durant la fase 2 i 3 del PAC (tipus de corrent que s'explica en el capítol 5, 6 i 7), en aquests casos, el tractament amb  $\beta$ -bloquejadors (preferiblement propanolol) s'hauria de combinar amb bloquejadors del canal de sodi com la mexiletina<sup>18</sup>.

Respecte del tractament en els pacients amb les formes de SQTL més malignes com la ST o SJLN, els  $\beta$ -bloquejadors necessiten ser combinats amb agents antiarítmics i normalment amb la implantació d'un DAI<sup>18</sup>.

Per últim, el tractament dels genotips minoritaris, com que estan relacionats als corrents responsables de SQT1, SQT2 i SQT3, per analogia són tractats com el SQT majoritari respectiu ja que no hi ha suficient informació per consensuar les relacions genotip-fenotip<sup>18</sup>.

En resum, es pot observar, per tant, que la importància del genotip en SQT es fa palesa ja que pot determinar les manifestacions electrocardiogràfiques, l'estratificació del risc, les causes sota les quals es pot desenvolupar una arítmia letal, i pot condicionar la teràpia<sup>26,52</sup>.

## **4. Síndrome de Brugada**

La SBr es va descriure per primera vegada el 1992 pels germans Brugada<sup>53</sup>. És una malaltia cardíaca hereditària caracteritzada per una elevació del segment ST en el ECG. Predisposa a un alt risc de MSC, taquicàrdies ventriculars polimòrfiques secundàries i FV en absència de defectes estructurals en el cor<sup>54-57</sup>.

La prevalença estimada dels pacients amb SBr varia en funció de la població. Per exemple, a Europa és d'entre 1-5 cada 10.000 habitants però al sud-est asiàtic és de 12 cada 10.000 habitants. És més comuna en homes (aproximadament el 80% dels casos) i l'edat mitjana de diagnosi entre els 40 i 45 anys<sup>56</sup>.

### **4.1. Fenotip i diagnòstic clínic**

#### **4.1.1. Criteris de diagnòstic**

El diagnòstic de la SBr requereix la presència d'una elevació prominent en forma còncava del segment ST a les derivacions precordials dretes ( $V_1$ - $V_3$ ) de l'ECG, que exposa un punt J ampli o un segment ST elevat  $\geq 2$  mm, seguit per una ona T negativa. Aquesta elevació és la que s'anomena SBr tipus 1 i és la diagnòstica (Figura 4A, SBr1). Les SBr tipus 2 i 3 són patrons de susceptibilitat a la SBr, però no són diagnòstiques: el patró tipus 2 és una elevació del punt J  $\geq 2$  mm, una elevació del segment ST  $\geq 1$  mm, i una ona T positiva o bifàsica (Figura 4A, SBr2); i en el tipus 3 també s'observa la forma còncava del segment ST però amb una elevació  $< 1$  mm (Figura 4A, SBr3)<sup>53,55,56,58</sup>. L'ECG dels

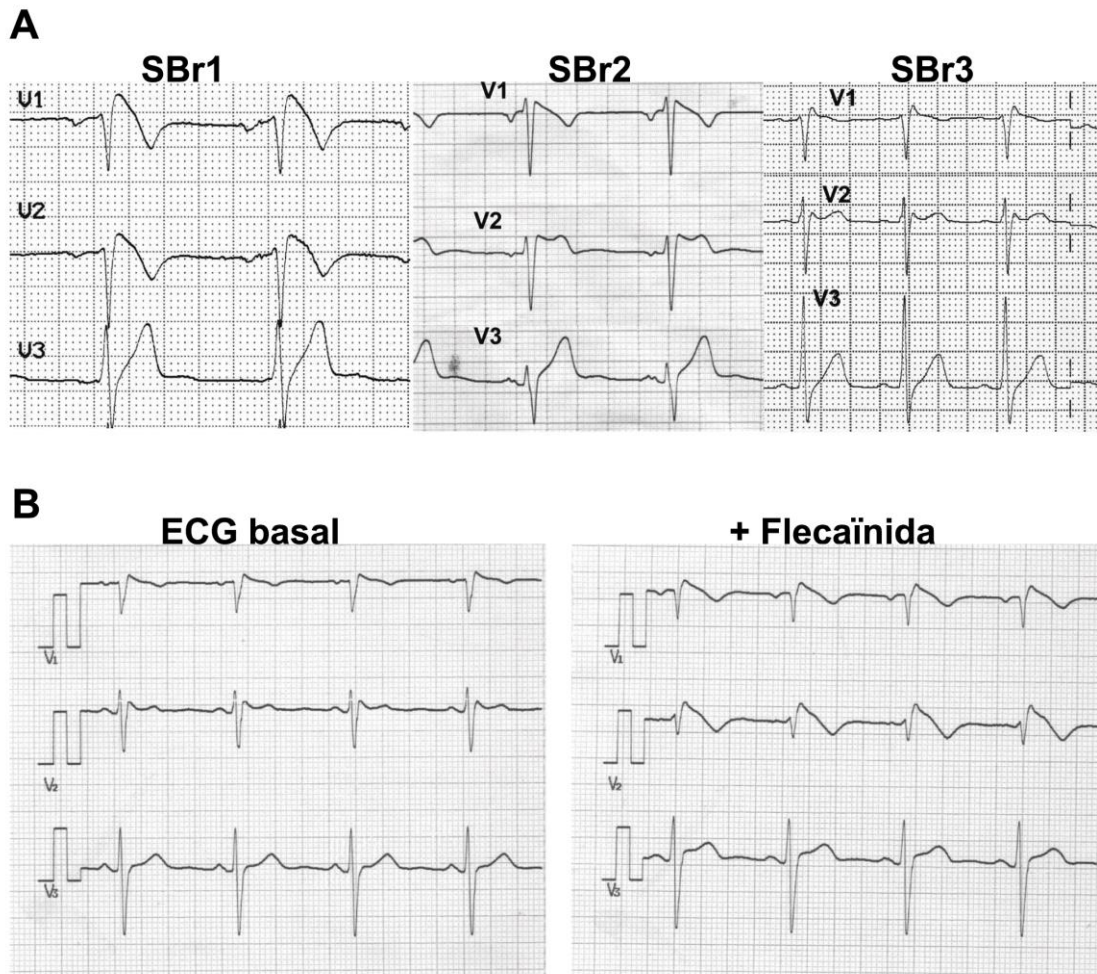


pacients amb SBr és dinàmic, i hi poden coexistir els tres patrons electrocardiogràfics en un mateix pacient en diferents moments.

D'altra banda, l'elevació es pot donar de manera espontània en l'ECG del pacient; o bé, hi ha pacients que mostren un ECG normal fins que es desemmascara la síndrome per algun factor extern com febre, desequilibris iònics, cocaïna, antidepressius tricíclics, antihistamínics de primera generació, o fàrmacs antiarítmics bloquejadors del canal de sodi (mexiletina, flecaïnida, ajmalina o procaïnàmida, entre d'altres)<sup>54,56-58</sup>.

Gràcies al fet els antiarítmics bloquejadors del canal de sodi poden desemmascarar SBr, s'utilitzen en l'àmbit clínic per desemmascarar-la de forma controlada<sup>59</sup>. Majoritàriament s'utilitza ajmalina o flecaïnida, i la prova només es considera positiva si es desemmascara un patró tipus 1 (Figura 4B)<sup>54-57</sup>.

La SBr només pot ser diagnosticada de manera definitiva si el pacient mostra un patró de SBr tipus 1 en el ECG (en almenys una de les precordials dretes, induït o no) més algun dels següents factors: FV documentada, taquicàrdia ventricular polimòrfica documentada, història familiar de MSC en menors de 45 anys, presència de familiars amb SBr encoberta, inducció d'arítmies ventriculars durant una estimulació elèctrica programada, síncope, respiració nocturna agònica i/o una mutació que pugui explicar el fenotip. Si el pacient només manifesta el patró tipus 1 en el ECG però sense cap dels altres criteris clínics, el diagnòstic serà de SBr idiopàtica<sup>54,56-58</sup>.



**Figura 4. Electrocardiogrames característics en pacients amb SBr. A.** ECG característics de SBr tipus 1, SBr tipus 2 i SBr tipus 3. **B.** Comparació de 2 ECG d'un mateix individu abans de ser tractat (ECG basal) i després de la infusió de flecaïnida on es pot observar l'elevació del segment ST de SBr tipus 1 a les derivacions V1 i V2. Font: Berne, 2012<sup>56</sup>.

#### 4.1.2. Estratificació clínica del risc

La SBr és la responsable d'un 4% de les MSC, i augmenten en un 20% a aquelles MSC sense cap defecte estructural cardíac<sup>58</sup>. Comparat amb la SQT, l'estratificació del risc en els pacients amb SBr es basa en criteris clínics.

Majoritàriament, les FV i la MSC tenen lloc a la nit o durant el son<sup>58</sup>. Un estudi va revelar que 26 dels 30 episodis registrats en pacients amb DAI implantats eren durant el son, la qual cosa mostra la importància de l'activitat vagal en l'aritmogènesis de la SBr<sup>60</sup>. Així mateix, el 2002, es va associar que la síndrome de la mort sobtada inexplicada nocturna — descrita a Filipines el 1917 amb una incidència molt alta al sud-est asiàtic majoritàriament en joves — és fenotípicament, genèticament i funcionalment, la mateixa malaltia que la SBr<sup>61</sup>.

La identificació dels pacients amb risc de patir MSC i la seva prevenció, és una de les tasques més importants en estudis d'aquesta malaltia en l'àmbit mèdic. A la literatura hi ha dos grans estudis de seguiment dels pacients amb SBr (334 pacients<sup>57</sup> i 1.029 pacients<sup>62</sup>), en els quals es determina que: els pacients que s'han diagnosticat després d'una MSC avortada tenen un risc molt alt de tornar a patir arítmies ventriculars (entre el 17 al 69% en els següents 48-84 mesos)<sup>57</sup>; els pacients que presenten síncope amb el patró típic de SBr1 a l'ECG de forma espontània tenen un risc del 6 al 19% de patir arítmies ventriculars als 24-39 mesos; i el risc de patir arítmies letals en els pacients asimptomàtics però amb patró de SBr1 al ECG, varia entre l'1 i el 8%<sup>57</sup>. Per tant, els pacients de SBr amb un MSC avortada o síncope previ tenen significativament un risc més alt de patir una arítmia ventricular que els asimptomàtics amb SBr<sup>62</sup>. També determinen que el temps que tarden a patir una arítmia cardíaca els pacients asimptomàtics amb SBr1

espontani, és significativament més curt que els que SBr1 induït, tot i això, en general, els pacients asimptomàtics tenen una probabilitat molt baixa de patir una arítmia cardíaca<sup>54,62</sup>.

D'altra banda, un estudi amb 460 pacients de SBr, Hiraoka *et al.* (2013)<sup>63</sup>, compara els factors de risc i la prognosi de pacients joves ( $\leq 35$  anys) respecte de pacients grans ( $> 35$  anys). Aquest estudi revela que el risc d'estratificació en els pacients joves és similar als obtinguts amb els pacients  $>35$  anys, i també similar als altres estudis pacients de SBr sense diferenciar l'edat<sup>57,62</sup>.

Finalment, existeixen controvèrsies en l'ús de l'estimulació elèctrica programada com a marcador per l'estratificació del risc. Així com en alguns estudis s'ha observat que pot ser marcador de futures arítmies cardíques<sup>57,62</sup>, altres estudis no ho observen<sup>64,65</sup>. Tot i això, a les guies de funcionament i prevenció de pacients amb arítmies ventriculars i MSC, utilitzen l'aparició d'una arítmia ventricular durant l'estimulació elèctrica programada com un marcador de risc en els pacients asimptomàtics amb SBr espontània<sup>2</sup>.

## **4.2. Implicacions de la diagnosi genètica en la SBr**

### **4.2.1. Gens implicats en la SBr**

El fet que els bloquejadors del sodi desemmascarin la SBr indica un rol clau de la inhibició del  $I_{Na}$  i la patologia de la malaltia. De fet, així ho demostra el fet que, fins a dia d'avui, més de 350 mutacions en el gen *SCN5A* s'han associat a aquesta malaltia des del 1998<sup>66,67</sup>. Tot i que

pacients amb mutacions en el gen *SCN5A* corresponen a la majoria dels casos (entre el 11 i el 24%<sup>68</sup>), mutacions a 17 gens més també s'han relacionat amb la malaltia: 7 gens relacionats amb una alteració del  $I_{Na}$  (*SCN1B*, *SCN3B*, *GPD1L*, *MOG1*, *SLMAP*, *FGF12* i *PKP2*); 3 gens amb una alteració de les  $I_{Ca}$  (*CACNA1C*, *CACNB2*, *CACNA2D1* i *TRPM4*); i 7 gens relacionats a un alteració de la  $I_K$  (*KCND3*, *KCNE1*, *KCNE3*, *KCNJ8*, *HCN4* i *ABCC9*).

Tot i això, el percentatge que representen els pacients amb mutació a aquests 17 gens és molt baix, i encara queda un percentatge molt alt de pacients, entre un 60-75% dels casos, al quals no se'ls ha diagnosticat la causa genètica<sup>68,69</sup> (Taula 4). A més, igual que en la SQTL, la publicació d'exomes complets de més de 6.500 individus de població general posa en discussió la patogenicitat d'algunes mutacions i l'associació d'alguns gens a SBr descrits<sup>68,70</sup>.

#### **4.2.2. Diagnosi genètica a la pràctica clínica**

La diagnosi genètica pot ser útil en la SBr per confirmar aquells casos de SBr1, i sobretot, per l'estudi de familiars amb casos índex amb mutació per tal de identificar aquells familiars risc i poder prendre precaucions. Principalment es recomana el rastreig del gen *SCN5A*, ja que és el que pot aportar més probabilitats de diagnòstic de mutació. En els casos de SBr2 i SBr3, la diagnosi genètica no està recomanada<sup>5,14</sup>.

Gen	Proteïna	Corrent iònic	Efecte funcional	Incidència
SCN5A	Na <sub>v</sub> 1.5	I <sub>Na</sub>	Pèrdua de funció	11-24%
GPD1L	G3PD1L	I <sub>Na</sub>	Pèrdua de funció	Rara (1mut)
CACNA1C	Ca <sub>v</sub> 1.2	I <sub>CaL</sub>	Pèrdua de funció	6-7%
CACNB2	Ca <sub>v</sub> β2	I <sub>CaL</sub>	Pèrdua de funció	4-5%
SCN1B	Na <sub>v</sub> β1	I <sub>Na</sub>	Pèrdua de funció	1-2%
KCNE3	Mirp2	I <sub>to</sub> /I <sub>Ks</sub>	Guany de funció	Rara (1mut)
SCN3B	Na <sub>v</sub> β3	I <sub>Na</sub>	Pèrdua de funció	Rara (2mut)
KCNH2	hERG1,Kv11.1	I <sub>Kr</sub>	Guany de funció	Rara (3mut)
KCNJ8	Kir6.1	I <sub>KATP</sub>	Guany de funció	Rara (1mut)
CACNA2D1	Ca <sub>v</sub> α2δ-1	I <sub>CaL</sub>	Pèrdua de funció	Rara (3mut)
RANGRF	MOG1	I <sub>Na</sub>	Pèrdua de funció	Rara (1mut)
KCNE5	Mirp4	I <sub>to</sub> /I <sub>Ks</sub>	Guany de funció	Rara (3mut)
KCND3	K <sub>v</sub> 4.3	I <sub>to</sub>	Guany de funció	Rara (2mut)
HCN4	HCN4	I <sub>f</sub>	Guany de funció	Rara (1mut)
SLMAP	SLMAP	I <sub>Na</sub>	Pèrdua de funció	Rara (2mut)
TRMP4	TRMP4	NSC <sub>Ca</sub>	Pèrdua i guany	6%*
PKP2	PKP2	I <sub>Na</sub>	Pèrdua de funció	2.5%*
ABCC9	SUR2A	I <sub>KATP</sub>	Guany de funció	4%*

**Taula 4. Taula resum dels gens associats a la SBr.** Els gens estan llistats per ordre de publicació. NSC<sub>Ca</sub> significa *Calcium activated Non-Selective Cation channel*. Incidència rara significa que s'han trobat entre 1 i 3 mutacions en el gen respectiu. \*Percentatge dins la població de SBr analitzats en els respectius estudis.

### **4.2.3. Penetrància incompleta i expressivitat variable**

L'herència de les mutacions en els pacients amb SBr és de transmissió autosòmica dominant, tot i això, hi ha penetrància incompleta, expressivitat variable i superposició fenotípica, igual que en altres malalties monogèniques d'herència mendeliana<sup>16,71-73</sup>.

Igual que en SQTL, factors individuals o exògens poden explicar part de la penetrància incompleta: com les diferències en funció del sexe per diferències hormonals<sup>16</sup>, la hipertèmia/febre<sup>74</sup>, o el tractament amb bloquejadors del canal de sodi,<sup>16</sup>. D'altra banda, el fet que a més algunes mutacions poden provocar diferents canalopaties (SBr, SQTL3 o SPCC), fa que s'hagi determinat que hi pot haver superposició de fenotips de diferents malalties cardíques en un mateix individu o en membres d'una mateixa família amb la mateixa mutació, complicant més la interpretació de la penetrància i la expressivitat d'una mutació<sup>75,76</sup>.

Tot i això, com que el percentatge de penetrància incompleta és alt i hi ha un percentatge elevat de pacients sense diagnosticar genèticament, s'estan començant a estudiar vies d'heretabilitat més complexes. Amb aquests estudis es pretén buscar nous factors de risc que puguin donar nous coneixements dels mecanismes moleculars que poden provocar la SBr i/o que puguin explicar la penetrància incompleta i l'expressivitat variable que influeixen en el fenotip fent que l'efecte d'aquestes mutacions causals de SBr depenguin de l'individu en particular<sup>16</sup>.

Estudis recents d'associació de genomes complets (GWAS, Genome-Wide Association Study) han revelat tres variants comunes estretament lligades a la malaltia (una al gen *SCN5A*, una al gen *SCN10A* i una al gen *HEY2*)<sup>77</sup>. Aquestes variants podrien afectar la patogenicitat de mutacions causals, com s'ha demostrat amb la variant comuna *SCN5A* p.(His558Arg)<sup>78</sup>. Així mateix, un estudi d'aquest mateix 2014 posa de manifest una possible interacció del promotor del gen *SCN5A* amb una regió no codificant reguladora del gen *SCN10A*. L'estudi d'una variant comuna en aquesta regió causa una reducció de l'expressió del *SCN5A*, i suggereix nous mecanismes genòmics fisiopatològics per la SBr<sup>79</sup>.

### 4.3. Mecanismes d'elevació del segment ST

Es proposen dos mecanismes per explicar l'elevació del segment ST en les precordials dretes que s'observen en un ECG tipus 1 de SBr<sup>80,81</sup>:

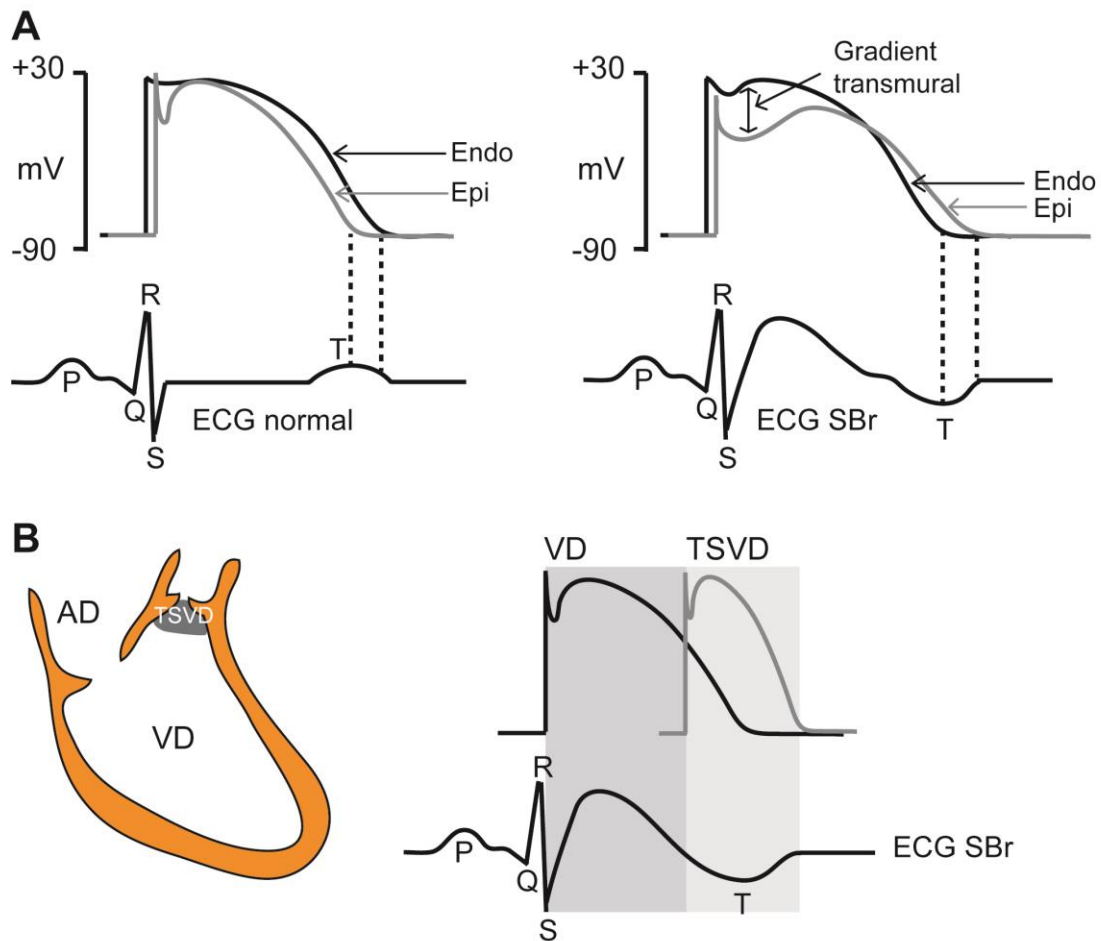
**Hipòtesi de desequilibri en la repolarització:** la primera hipòtesi de mecanisme es focalitza en un desequilibri a la repolarització primerenca del ventricle dret del miocardi. Aquest fenomen seria degut al fet que la pèrdua de funció del canal de sodi altera d'una manera diferent les cèl·lules de l'epicardi respecte a les de l'endocardi, a causa de les diferències intrínseques d'aquestes. El corrent sortint  $I_{to}$  és més prominent a les cèl·lules de l'epicardi del ventricle dret comparat amb les de l'endocardi. En condicions normals, el corrent sortint  $I_{to}$  s'activa a causa de la despolarització ràpida de la membrana, i s'oposa a la despolarització provocada pel corrent de  $Na^+$  que genera una petita osca



de la fase 1 del PAC, després l'equilibri també amb el corrent de  $\text{Ca}^{+2}$  dóna l'entrada a la fase *plateau* en forma de cúpula. La hipòtesi és que a l'epicardi, com que hi ha molt més corrent sortint  $I_{\text{to}}$ , una reducció del  $I_{\text{Na}}$  provoca una descompensació iònica significativa, i incrementa la relació entre el corrent de sortida de  $\text{K}^+$  i el corrent entrant de  $\text{Na}^+$ . Aquesta descompensació provoca una repolarització prematura i una alteració a la morfologia del PAC. En canvi, en l'endocardi a on el corrent  $I_{\text{to}}$  és menys significatiu, la reducció del  $I_{\text{Na}}$  no descompensa tant el balanç dels corrents, i la morfologia del PAC de l'endocardi segueix sent similar. L'alteració en la morfologia del PAC de l'epicardi augmenta el gradient transmural entre l'endocardi i l'epicardi, que és el que finalment s'observa en forma d'elevació del segment ST en el ECG d'un pacient amb SBr. A més, aquesta descompensació a l'epicardi produeix una fase *plateau* més llarga que en l'endocardi, fent negativa la ona T<sup>80,82</sup> (Figura 5A).

**Hipòtesi de desequilibri en la despolarització:** el segon mecanisme, es focalitza en un desequilibri a la despolarització. La reducció del  $I_{\text{Na}}$ , per una mutació o per bloquejadors, causaria un alentiment considerable de la conducció del Tracte de Sortida del Ventricle Dret (TSVD o *RVOT* en anglès) respecte a la conducció del Ventricle Dret (VD). En conseqüència, es registre l'elevació del segment ST i la inversió de l'ona T (Figura 5B)<sup>81</sup>.

Tant una hipòtesi com l'altra segueixen sent vàlides ja que hi ha evidències que sostenen tant una com l'altra, i en canvi no hi ha evidències que en refusin cap de les dues<sup>81</sup>.



**Figura 5. Esquemes de les dues hipòtesis de mecanisme d'elevació del segment ST en un ECG tipus 1 de SBr. A.** Hipòtesi de desordre en la repolarització. **B.** Hipòtesi de desordre en la despolarització. Hipòtesis explicades en el text.

#### 4.4. Tractament

La implantació d'un DAI és l'única estratègia efectiva i consensuada en el tractament i la prevenció de la MSC en els pacients amb SBr<sup>54-56,58</sup>. Tot i això, les seves complicacions i que bona part de la població no hi pot tenir accés (infants i joves, i persones en un context socioeconòmic advers) fa necessari l'estudi de tractaments més econòmics i a l'abast de tota la població<sup>55,56</sup>.

A diferència de la SQTLL no s'ha establert un tractament farmacològic en funció del genotip. No obstant això, s'estan fent avenços pel tractament de la síndrome que ataquen al desequilibri iònic que de la fase 1 del PAC: fàrmacs com la quinidina que disminueixen el corrent  $I_{to}$ ; fàrmacs que augmenten els corrents positius entrants de  $Ca^{+2}$  o de  $Na^{+}$ , com els agents  $\beta$ -adrenèrgics que augmenten el  $I_{Ca}$ , i la Dimethyl Lithosermate B que alenteix la inactivació del canal de sodi; o fàrmacs inhibidors de les fosfodiesterases III, que augmenten  $I_{Ca}$  i disminueixen  $I_{to}$ <sup>56</sup>.

## **5. Electricitat cel·lular**

En els tres blocs anteriors, s'ha descrit l'activitat elèctrica cardíaca, i com una disfunció d'aquesta pot provocar canalopaties cardíques com la SQTL o la SBr, entre d'altres. Tots tres s'han descrit des d'un punt de vista macroscòpic, però s'ha pogut observar que el correcte funcionament recau sobre les subunitats que formen els canals iònics cardíacs i les proteïnes que regulen els funcionament i localització d'aquests canals. Tal i com s'ha dit, aquests canals es troben a la membrana plasmàtica, són selectius a un ió i són dependents de voltatge.

D'altra banda, en el marc teòric de la SQTL i la SBr, s'ha pogut observar que ambdues malalties es poden desencadenar per alteracions en el  $I_{Na}$ . Aquesta tesi se centra principalment en mutacions a les proteïnes que configuren el canal de sodi cardíac dependent de voltatge en relació amb la SQTL i la SBr.

És per això que en aquest capítol, i en els següents, es descriurà la complexitat de l'electricitat cel·lular des d'un punt de vista més microscòpic: les propietats biofísiques dels canals iònics, tècniques utilitzades pels registres dels corrents i en concret, les propietats biofísiques del corrent de sodi (Capítol 5); l'estructura de les subunitats que formen els canals de sodi, en concret el canal de sodi cardíac, i els factors que influeixen en tenir un canal funcional a la membrana (Capítol

6); i finalment, les alteracions concretes del corrent de sodi cardíac que poden explicar el fenotip de la SQTl i la SBr (Capítol 7).

### **5.1. Propietats elèctriques dels canals iònics dependents de voltatge**

La membrana plasmàtica, formada per la bicapa lipídica, és hidrofòbica i per tant impermeable als ions. En les cèl·lules excitable, la membrana plasmàtica està carregada elèctricament a causa de la diferència en el gradient iònic entre l'exterior i l'interior cel·lular. Aquest gradient iònic permet emmagatzemar energia elèctrica com en una bateria, de manera que la membrana d'una cèl·lula es pot observar com un condensador. Aquesta distribució asimètrica de les càrregues (dels ions), crea una diferència de potencial o de voltatge a la membrana ( $V_m$ , mesurada en volts (V))<sup>83,84</sup>.

Els canals iònics actuen com a conductors dels ions, per tant, són els que introdueixen la conductància a la membrana disminueix la resistència que aquesta ofereix al pas dels ions.

D'altra banda, la difusió d'un ió X dependrà de la concentració d'aquest a una banda i altra de la membrana. L'ió sempre es difondrà cap a on hi hagi menys concentració d'aquest ió.

Els potencials de membrana originats per la difusió dels ions s'anomenen potencials de difusió, que serà zero quan l'ió hagi arribat al seu potencial d'equilibri electroquímico. En una situació a on la concentració d'un ió X sigui coneguda a l'interior  $[X]_i$  i a l'exterior cel·lular  $[X]_o$ , es pot calcular el

potencial d'equilibri de l'ió ( $V_x$ ) a través de l'equació de Nerst\* (a on R és la constant dels gasos, T la temperatura, z la valència de l'ió, i F, constant de faraday, per un ió X a una temperatura X el valor  $RT/zF$  és constant):

$$*V_x = RT/zF \ln [X]_o / [X]_i^{83,84}.$$

La taula 5 mostra els potencials d'equilibri dels diferents ions involucrats en el potencial d'acció, en unes concentracions similars a les fisiològiques en el múscul cardíac i a una temperatura de 37°C .

Ió	RT/zF	[X] <sub>o</sub> (mM)	[X] <sub>i</sub> (mM)	[X] <sub>o</sub> /[X] <sub>i</sub>	V <sub>x</sub> (mV)
Na <sup>+</sup>	26.73	145	12	12	+67
K <sup>+</sup>	26.73	4.5	155	0.026	-95
Ca <sup>+2</sup>	13.37	2	0.0001	10000	+132
Cl <sup>-</sup>	26.73	116	4.2	29	-89

**Taula 5. Concentracions iòniques i potencial d'equilibri dels diferents ions involucrats en el potencial d'acció en múscul cardíac de mamífer a 37°C.** mM, mil·liMolar i mV, mil·liVolts. Els altres símbols es citen al llarg del text.

Per un determinat ió X, el corrent dependrà del voltatge, i de la permeabilitat de l'ió (o conductància), per tant segueix la llei d'Ohm<sup>83,84</sup>:

$$I = V/R = V \cdot G$$

Sent I el corrent de l'ió (mesurat en Ampers, A), V el potencial, i G la conductància (mesurada en siemens, S).

Ara bé, el corrent serà negatiu quan el potencial de membrana ( $V_m$ ) sigui més negatiu que el potencial d'equilibri de l'ió ( $V_x$ ), en canvi, serà positiu quan el  $V_m$  sigui més positiu que  $V_x$ . La quantitat de corrent iònic variarà en funció de la diferència entre el  $V_m$  i el  $V_x$ , i de la conductància

macroscòpica per aquest ió X, per tant, el corrent d'un ió segueix l'anomenada llei d'Ohm modificada:

$$I_x = G_x \cdot (V_m - V_x)$$

Es pot observar que com més gran és la diferència entre  $V_m - V_x$  més gran és el corrent. Aquesta propietat s'anomena força impulsora (o *driving force* en anglès). El *driving force* serà més gran com més allunyat estigui la diferència de potencial de membrana del potencial d'equilibri de l'ió.

La  $I_x$  pot ser igual a zero en dues situacions: (1) perquè la membrana és impermeable als ions i per tant no hi ha conductància ( $G_{Na} = 0$  S); o (2) perquè el *driving force* és 0, per tant quan el potencial de membrana és igual al potencial d'equilibri de l'ió ( $V_m - V_x = 0$ )<sup>83,84</sup>.

En el cas dels canals dependents de voltatge, la conductància i permeabilitat macroscòpica dels ions, depenen de les propietats biofísiques del canal<sup>83,84</sup>.

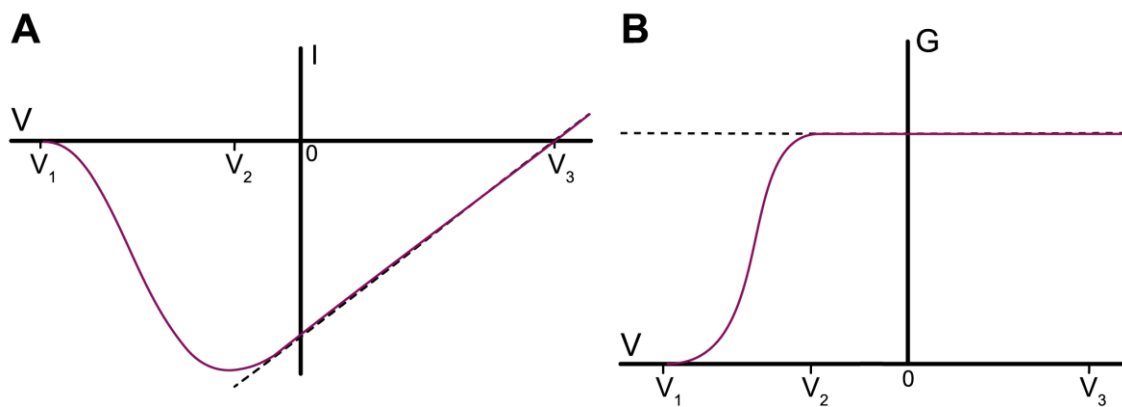
La conductància macroscòpica per cada voltatge dependrà de la conductància unitària del canal (que vindrà determinat pel *driving force* ( $g_x$ )), de la probabilitat d'obertura d'aquest canal (que dependrà del voltatge aplicat ( $P_{o(V)}$ )), i del número de canals presents a la membrana de la cèl·lula (N):

$$G_x = g_x \cdot N \cdot P_{o(V)}$$

En un sistema a on només podem registrar el corrent d'un sol tipus d'ió X, el corrent registrat serà la suma del corrent que passa a través de tots els conductors elementals, per tant, de tots els canals.

Si estudiem el corrent de sodi d'una cèl·lula, es pot observar que en el potencial de repòs de la membrana (vora  $-90\text{mV}$ ,  $V_1$ ), no hi ha  $I_{\text{Na}}$  (Figura 6 A i B). En aquesta situació la  $G_{\text{Na}}$  és zero perquè els canals de sodi es troben en estat tancat a potencials negatius i, encara que el *driving force* és molt gran, el  $I_{\text{Na}}$  és 0 mV.

A mesura que es va despolaritzant la membrana, el  $I_{\text{Na}}$  va augmentant gràcies al fet que la probabilitat d'obertura del canal augmenta per la dependència de voltatge.



**Figura 6. Relació corrent (I) - voltatge (V) a la membrana cel·lular.** **A.** Gràfic que correspon a la relació I-V d'un canal de sodi dependent de voltatge. El gràfic mostra la quantitat de corrent I a cada voltatge. A  $V_1$ , el voltatge és molt negatiu de manera que no s'obre cap canal i el  $I_{\text{Na}}$  és 0 pA. A  $V_2$ , la probabilitat d'obertura és màxima i el *driving force* és gran, de manera que es registra un pic de corrent. A  $V_3$ , el voltatge de la membrana i el voltatge d'equilibri de l'ió s'igualen i el corrent és 0 pA. **B.** La conductància (G) corresponent a cada voltatge, en relació al gràfic A: a  $V_1$  no hi ha corrent per tant la conductància és 0, a  $V_2$  el  $I_{\text{Na}}$  és màxima (prop de 0 mV) la conductància és màxima, i a  $V_3$  la conductància és màxima, però  $I_{\text{Na}}$  és igual a 0 Pa perquè no hi ha *driving force*. Les línies puntejades d'ambdós gràfics representen la màxima conductància. En aquest moment, disminueix el  $I_{\text{Na}}$  a causa de la disminució del *driving force*.



Prop de 0mV ( $V_2$ , Figura 6 A i B) la probabilitat que els canals estiguin oberts és màxima, per tant la conductància és màxima, i com que el *driving force* encara és gran es registra el pic de corrent. A partir d'aquí, la conductància sempre és màxima, i la quantitat  $I_{Na}$  que es registra depèn del *driving force*. A mesura que el potencial de membrana es va acostant al potencial d'equilibri, el  $I_{Na}$  registrat disminueix. En el moment en què el potencial de membrana s'igualava al potencial d'equilibri de l'ió no es registra  $I_{Na}$  ( $V_3$ ). A partir d'aquí el gradient es reverteix i el corrent és positiu o sortint (Figura 6 A)<sup>83</sup>.

## 5.2. Registre dels corrents cel·lulars

El 1939 i 1940 Hodgkin i Huxley per un costat, i Curtis i Cole per l'altre, van realitzar els primers registres de potencials d'acció dels axons gegants de calamar<sup>85,86</sup>. El 1949, Cole desenvolupa la primera tècnica per poder controlar el voltatge de la membrana i poder veure així les diferències en la conductància. Els treballs realitzats i les equacions concebudes per Hodgkin i Huxley el 1952, van poder explicar la generació i propagació dels potencials d'acció i en aquest moment es va delinear el concepte de canal iònic, els protocols bàsics de polsos per generar les corbes I-V, i les corbes d'activació i d'inactivació dependents de voltatge<sup>87</sup>.

Més endavant, es va descobrir que la neurotoxina tetrodotoxina (TTX) bloquejava els canals de sodi, la qual cosa va permetre registrar els corrents de potassi de manera aïllada; i que el tetraethylammonium

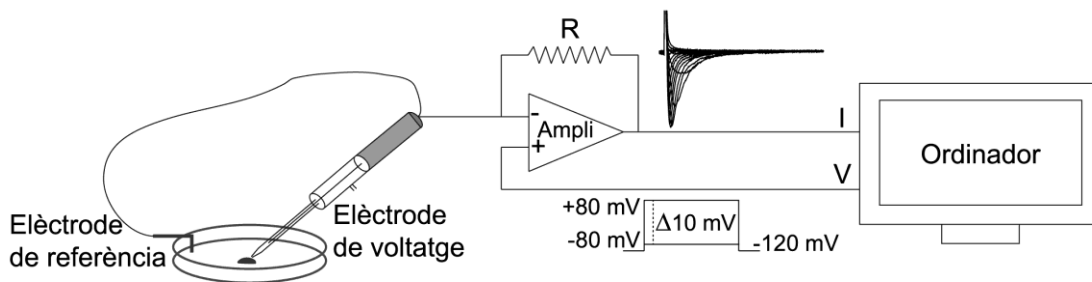
(TEA) bloquejava els canals de potassi i permetia registrar el corrent de sodi aïllat. Tots aquests descobriments van permetre tota una sèrie d'estudis, gràcies als quals, als anys 70 ja estaven ben establerts conceptes com el de *porus conductor de ions*, el d'*obertura intracel·lular i extracel·lular selectiva*, i el de *dependència de voltatge de la conductància* (revisat per Bezanilla, 2008<sup>88</sup>).

El 1976, es va realitzar per Neher i Sackmann el primer registre d'un canal únic utilitzant unes micropipetes pressionant fibres musculars de granota. Immediatament es va reconèixer que si s'aplicava una pressió negativa quan la pipeta estava pressionant la membrana de la cèl·lula es creava un segell entre la membrana i la pipeta que excedia el gigaohm. En aquest moment es va concebre la tècnica *Patch Clamp* (Figura 7)<sup>89</sup>. Tot i que l'aplicació del *patch clamp* es va idear per poder registrar canals únics, ràpidament es va observar que permetia registrar també els corrents macroscòpics d'una cèl·lula sencera amb més nitidesa que els microelectrodes. A partir d'aquí es van començar a registrar altres cèl·lules, com neurones i cardiomiòcits, la qual cosa va permetre augmentar el coneixement en corrents, selectivitat iònica, permeabilitat i dependències de voltatge.

### **5.2.1. Registre dels corrents per *patch clamp***

La tècnica de *patch clamp* permet donar polsos quadrats de voltatge a la cèl·lula i rebre el corrent que es genera a la membrana plasmàtica en resposta al pols (*voltage clamp*), o bé, només en les cèl·lules excitable,

excitar a través d'un pols de corrent la cèl·lula i registrar les diferències de potencial que es creen a la membrana de la cèl·lula plasmàtica (*current clamp*). Així mateix, es poden realitzar registres de corrent de tota la cèl·lula (corrent macroscòpic,  $I$ ), o el que condueix un canal únic (corrent unitària,  $i$ ).



**Figura 7. Esquema representatiu de la tècnica de *patch clamp*.** L'elèctrode de referència es troba immers a la solució de bany, mentre que l'elèctrode de voltatge es troba a l'interior de la pipeta amb la qual se segella la cèl·lula. El braç en el qual està connectada la micropipeta i l'elèctrode de voltatge, és el micromanipulador i preamplificador (en gris a la figura) a on s'hi connecta també l'elèctrode de referència. El preamplificador, està connectat a l'amplificador (ampli) i aquest a l'ordinador. Entre l'ordinador i l'amplificador hi ha un convertidor de senyal analògic-digital i digital-analògic no representat a la figura. En configuració de *voltage-clamp* s'envien els pols de voltatge i es reben els corrents generats per la cèl·lula en resposta a aquests pols; i en configuració de *current-clamp* s'envien pols de corrent i es registren els canvis de voltatge de la membrana cel·lular.

**Whole-cell:** El corrent de sodi macroscòpic mostrat a la figura 8E es pot registrar a través del mètode *whole-cell voltage clamp*. S'utilitza una micropipeta de vidre amb un microelectrode a l'interior per monitoritzar tant el potencial com el corrent que passa a través de la cèl·lula (Figura 7). La micropipeta es presenta a la membrana, i s'aplica succió a

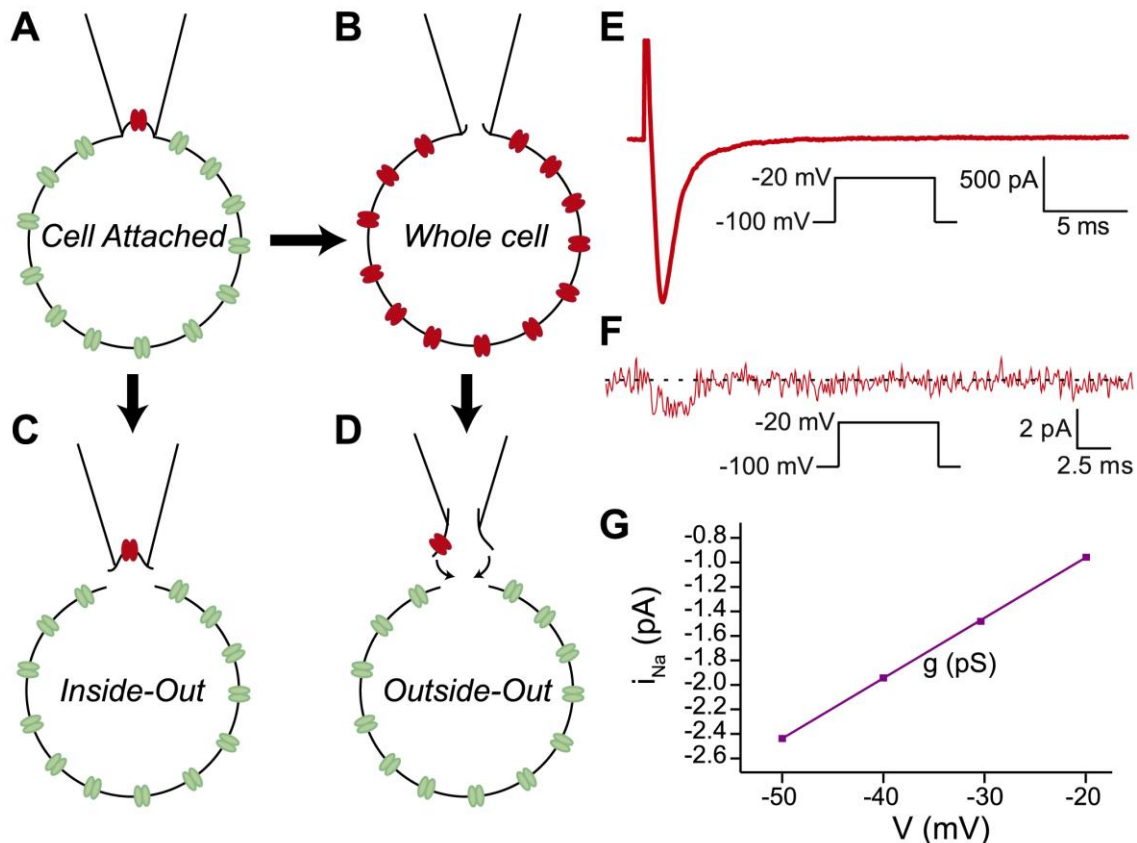
l'interior de la pipeta per tal de formar un segell d'alta resistència entre la pipeta i la membrana cel·lular (*Gigaseal*). Aquest tros de membrana segellada amb la pipeta és el que s'anomena el *patch*. Després, amb una altra succió es trenca la membrana per la zona del *patch* i es crea un camí continu de baixa resistència entre l'interior de la cèl·lula i la pipeta (Figura 8B). Aplicant un protocol de voltatge fixat s'obté el corrent macroscòpic, de sodi en aquest cas, en resposta aquest voltatge (Figura 8E).

D'altra banda, el corrent que condueix un únic canal es pot registrar de tres maneres diferents:

***Cell attached:*** Es crea el *gigaseal* i llavors, enlloc de trencar el *patch* com en el corrent macroscòpic, es registre directament el corrent que passa a través del trosset de membrana segellada (Figura 8A). Només es registrarà el corrent del canal que està a dins del *patch*. En aquesta configuració es controla la solució de la cara externa del canal (que es troba a dins la pipeta), però no la interna ja que no s'hi té accés.

***Inside-out patch:*** En el moment del *cell attached* se separa la porció de membrana del *patch* de la membrana plasmàtica, i es mesura el corrent del canal que es troba a l'interior (Figura 8C). En aquest cas, la solució del bany estarà en contacte amb la cara interna del canal, i la de la pipeta amb l'externa.

***Outside-out patch:*** Es trenca el *patch* com amb el *whole cell*, i llavors, se separa de la resta de la membrana com en el *inside patch*, s'espera



**Figura 8. Registres macroscòpics i de canal únic per *patch clamp*.** A - D. Imatges representatives d'una cèl·lula segellada amb una pipeta amb configuració de *cell attached* (A), *whole cell* (B), *Inside-out* (C) i *Outside-out* (D), respectivament. E. Corrents macroscòpica representativa obtinguda configuració de *whole cell*. F. Corrent unitària representativa que es pot obtenir amb *cell attached*, *inside-out* o *outside-out*. Ambdós corrents (E i F) han sigut obtinguts a -20 mV venint d'un potencial base de -100 mV, en cèl·lules CHO. G. Gràfic I-V de corrent unitària ( $i_{Na}$ ) versus voltatge. La conductància unitària ( $g$ ).

que la membrana es ressegelli, quedant la part interna del canal a l'interior de la pipeta i l'externa a la solució de bany (Figura 8D).

Les petites transicions de corrent rectangulars que s'observen a la figura 8F al mesurar el corrent unitària ( $i$ ) d'un canal, corresponen a l'obertura i al tancament del canal. Al realitzar el gràfic de corrent unitària ( $i_{Na}$ ) dels canals únics de sodi *versus* el voltatge en el qual s'han mesurat els

corrents, obtenim una corba I-V de canal únic. La pendent de la I-V unitària és equivalent a la conductància unitària del canal (g) (Figura 8G). En aquesta tesi, dos dels articles presentats se centren en el registre del corrent de sodi. S'utilitzaran les configuracions de *whole cell* i de *cell attached* pel registre del corrent de sodi macroscòpic i únic, respectivament; en les condicions, solucions i sistemes d'expressió heteròlogues descrites a la metodologia dels articles corresponents.

### 5.2.2. Sistemes d'expressió heteròloga

Els avenços en biologia molecular i en l'ús de sistemes d'expressió heteròloga han permès que es pugui registrar i investigar les propietats dels canals i les alteracions que es donen en aquests a causa de fàrmacs o mutacions. Els sistemes d'expressió heteròloga més utilitzats a la literatura per aquests tipus d'estudi són les línies cel·lulars immortalitzades HEK293 (*Human Embryonic Kidney*, o la línia derivada HEK293 tsA201), CHO (*Chinese Hamster Ovary*) i ovòcits de *Xenopus laevis* (exemples d'estudis<sup>90-94</sup>). En els últims anys s'han establert també línies cel·lulars immortals més similars als cardiomiòcits com les cèl·lules HL-1, derivades de cardiomiòcits auriculars de ratolí, o les H9C2, cardiomiòcits ventriculars de rata (exemples d'estudi: Baroni *et al.*, 2013; i Cerrone *et al.*, 2013<sup>95,96</sup>).

També s'han realitzat estudis en models animals i animals transgènics aïllant els cardiomiòcits o neurones per poder registrar els corrents *wild-type* (WT) o mutades (exemple d'estudi Lopez-Santiago *et al.*, 2007<sup>97</sup>).

Finalment, els avenços en reprogramació cel·lular, han fet possible l'obtenció de miòcits cardíacs derivats de cèl·lules mare pluripotencials (*induced pluripotent stem cells*, *iPS cells*), podent registrar directament els corrents de cèl·lules derivades a cardiomiòcits dels mateixos pacients a partir de teixit epitelial (exemple d'estudi Fatima *et al.*, 2013; i Priori *et al.*, 2013)<sup>98,99</sup>. En aquests últims tipus cel·lulars més propers a les cèl·lules excitables, és possible mesurar els potencials d'acció espontanis o induïts per injecció de corrent.

### **5.3. Propietats biofísiques dels canals de sodi dependent de voltatge**

A través dels registres realitzats des de Hodgkin i Huxley, es va poder establir que a part de la propietat de selectivitat iònica, els canals de sodi dependents de voltatge tenen dues propietats funcionals claus: (1) la dependència de voltatge de l'activació, i (2) la inactivació ràpida. Per tant, els canals de sodi dependents de voltatge els podem trobar en tres estats majoritaris: obert (O), tancat (T) o inactivat (I), tot i que per assolir cada estat major passa per diferents estats intermedis<sup>100</sup>.

Seguidament, en aquest mateix capítol, es descriuran breument en quines condicions s'assoleixen els diferents estats del canal de sodi i els protocols per tal de poder-ne registrar les diferents propietats biofísiques<sup>100,101</sup>. A continuació, en el capítol 6, s'explicaran les estructures moleculars dels canals de sodi dependents de voltatge, i

s'exposaran també els diferents gens que codifiquen per les diferents subunitats  $\alpha$  dels diferents canals de sodi dependents de voltatge.

Tot i que no hi ha grans diferències en el tipus de corrent que condueixen les diferents isoformes dels canals de sodi dependent de voltatge humà, en aquest capítol els protocols i les imatges obtingudes dels registres són de la subunitat  $\alpha$  del canal de sodi majoritària al cor, la  $Na_v1.5$ .

### 5.3.1. Tancat

El canal de sodi cardíac es troba en estat de repòs (o tancat) a potencials molt negatius. Fisiològicament la membrana plasmàtica es troba a uns -90mV. Pels registres de *patch clamp* s'acostuma a donar un potencial base de -120mV/-100mV per assegurar que tots els canals estiguin tancats i per tant disponibles per poder tornar a ser activats. En aquesta conformació, el canal no permet l'entrada de  $Na^+$  a la cèl·lula i per tant el corrent que es registraria seria de 0 pA.

### 5.3.2. Obert o activat

A partir d'un pols despolaritzant, a -20mV per exemple, els canals s'activen ràpidament per tal de poder despolaritzar les cèl·lules en la fase 0 del PAC. En una cèl·lula que s'estigui registrant per *voltage clamp*, al donar el pols despolaritzant es registra una entrada de ions  $Na^+$  a l'interior de la cèl·lula (com el representat a la Figura 8E).

### **Corba I-V**

La figura 9A és un registre de  $I_{Na}$  obtingut per *patch clamp* mode *whole cell*, a on es pot observar el  $I_{Na}$  obtingut a diferents voltatges



despolaritzants. Es pot observar que quan es dona un pols de -80mV no hi ha  $I_{Na}$  (vermell), per tant el voltatge no és suficientment despolaritzant perquè els canals entrin a l'estat d'obert. En canvi, a -40mV (taronja) i a -20mV (verd) ja es pot registrar corrent. A -40mV s'observa menys  $I_{Na}$  que a -20mV perquè la probabilitat d'obertura a -40mV encara no és màxima en comparació a -20mV. Si es genera un gràfic de la quantitat de corrent al pic respecte a cada voltatge, s'obté la relació I-V representada a la Figura 6A. Com que el corrent macroscòpic depèn directament del número de canals a la membrana, el pic de corrent obtingut a cada voltatge es normalitza per la capacítància de la cèl·lula, perquè no afecti la mida de la cèl·lula en la quantitat de corrent obtingut.

### **Activació dependent de voltatge**

A partir del mateix protocol es pot mesurar la dependència de voltatge de l'activació. Mesurant la conductància (G) obtinguda a cada voltatge, a través de l'equació de la llei d'Ohm modificada:

$$G_{Na} = I_{Na, \text{ al pic}} / (V_{\text{donat}} - V_{Na}),$$

es pot generar el gràfic en relació a la conductància màxima ( $G_{\text{max}}$ ) ( $G/G_{\text{max}}$ , Figura 9C). De la gràfica obtinguda es mesura el valor  $V_{1/2}$ , que aporta el voltatge en el qual es troben el 50% dels canals activats.

### **5.3.3. Inactivació ràpida**

Els canals de sodi comencen a inactivar-se tant bon punt s'han oberts. Tal i com es pot observar a la figures 9A al cap de pocs mil·lisegons del pic de corrent màxima, la inactivació ja és gairebé completa. Només quan hi

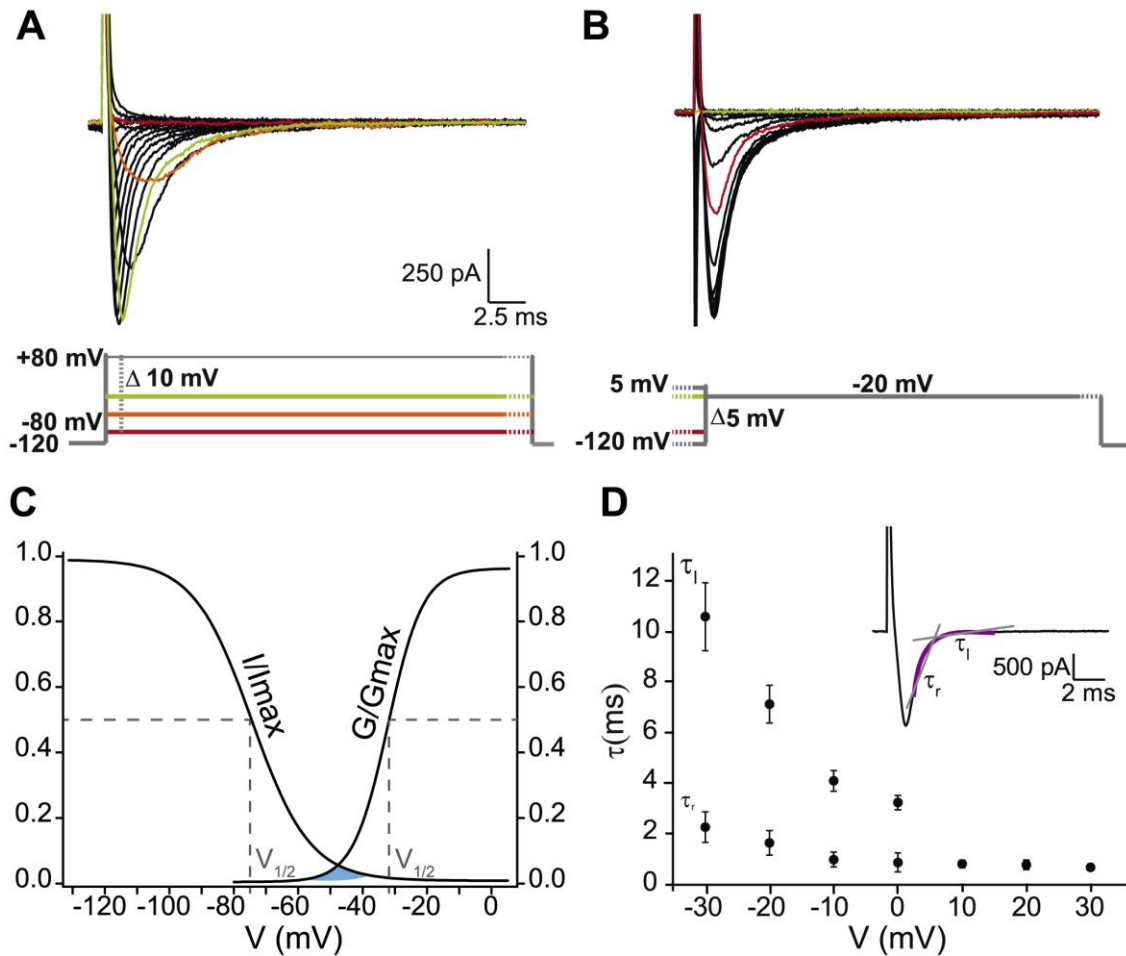
hagi una repolarització i es torni al potencial de repòs, els canals tornaran a estat de tancat.

### ***Inactivació en estat estacionari o inactivació dependent de voltatge***

Amb el protocol de la Figura 9B, es pot mesurar quantitat de  $I_{Na}$  a  $-20mV$  després d'haver passat per diferents voltatges despolaritzants sense passar per un potencial de repòs. L'objectiu és obtenir la fracció de canals viables per poder-se activar en el pols de  $-20mV$  ( $I/I_{max}$ , Figura 9C). Com en l'exemple anterior, com que a  $-80 mV$  els canals estan tancats, i per tant encara són viables per tornar a ser oberts, quan s'aplica un pols de  $-20mV$  hi ha  $I_{Na}$ . En canvi, aplicant un prepols de  $-20mV$  tots els canals s'han obert i inactivat al cap de pocs ms, es per això, que sense aplicar un voltatge repolaritzant per poder-se tancar, tots els canals segueixen inactivats, i en el segon pols a  $-20mV$  no s'observa  $I_{Na}$ . De la gràfica obtinguda, es pot mesurar el valor  $V_{1/2}$  de la inactivació, que dóna el voltatge en el qual hi ha el 50% dels canals inactivats (Figura 9C).

### ***Cinètica d'inactivació ràpida***

Amb els mateixos registres obtinguts amb el protocol de la figura 9A es pot mesurar la constant de temps d'inactivació, que és el temps que tarda el corrent en arribar al 63% de la inactivació des del pic d'amplitud màxima, als diferents voltatges. Ajustant el corrent mentre s'està inactivant a una doble exponencial, es pot obtenir la constant de temps d'inactivació (tau ( $\tau$ ) ràpida ( $\tau_r$ ) i la  $\tau$  lenta ( $\tau_l$ )) (Figura 9D).



**Figura 9. Protocols de voltatge i gràfics resultants dels registres de  $I_{Na}$  per *whole cell patch clamp*, en cèl·lules HEK transfectades. **A.** Corrents macroscòpics obtinguts després d'un increment de polsos despolaritzats, de -120mV (potencial base) a -80mV fins a +80mV cada 10mV. Es representa en colors el corrent obtingut a -80mV (vermell), -40mV (taronja) i -20mV (verd). **B.** Corrents macroscòpics obtinguts a -20mV després d'un prepuls a diferents potencials despolaritzant de 50ms (de -120mV fins a 5mV, cada 5mV). Es representa el corrent obtingut a -80mV (vermell) i -20mV (verd). **C.** Gràfic de la conductància respecte al voltatge ( $G/G_{max}$ ), obtingut a partir del protocol A; i gràfic de inactivació dependent de voltatge obtingut a partir dels corrents del protocol B ( $I/I_{max}$ ). L'àrea blava és l'anomenada finestra de corrent. Els  $V_{1/2}$  obtinguts es marquen en gris. **D.** A partir del protocol A, també s'obté la cinètica d'inactivació ajustant una doble exponencial al corrent mentre s'inactiva (en violeta) obtenint la constant d'inactivació ràpida ( $\tau_r$ ) i lenta ( $\tau_l$ ).**

***Finestra de corrent***

En el gràfic 9C, es pot observar pintada en blau la finestra de corrent entre les corbes d'activació i la inactivació. En aquesta regió, existeix una població de canals disponibles per ser activats (no es troben inactivats), i al mateix temps l'activació no és nul·la. L'activació dels canals de sodi en aquest rang de voltatges pot donar lloc a un corrent de sodi sostingut. Aquest corrent de sodi sostingut, només es produirà en aquests rangs de voltatges (-70mV a -40mV), que en condicions fisiològiques tenen lloc durant la repolarització a la fase 2-3 del PAC.

***Recuperació de la inactivació ràpida***

Un cop els canals s'han inactivat i es torna al potencial de repòs, aquests canals necessiten un temps per recuperar-se de la inactivació i tancar-se. Un cop tancats podran tornar-se a obrir. Amb un protocol de dos pulsos, en els quals entre pols i pols s'aplica a diferents temps creixents de recuperació a -120mV (entre 1 i 80ms) (Figura 10A esquerra), es pot observar com amb pocs mil·lisegons la capacitat de recuperació augmenta exponencialment a mesura que augmenta el temps donat de recuperació. Fent el gràfic del corrent obtingut a -20mV (P2) després de passar pels diferents intervals de temps a -120mV, i normalitzat pel corrent màxim obtingut al primer pols (P1), es pot obtenir la constant de temps de recuperació de la inactivació ( $\tau$ ) en ajustar el gràfic a una monoexponencial o biexponencial (Figura 10A).

#### 5.3.4. Inactivació tardana o profunda

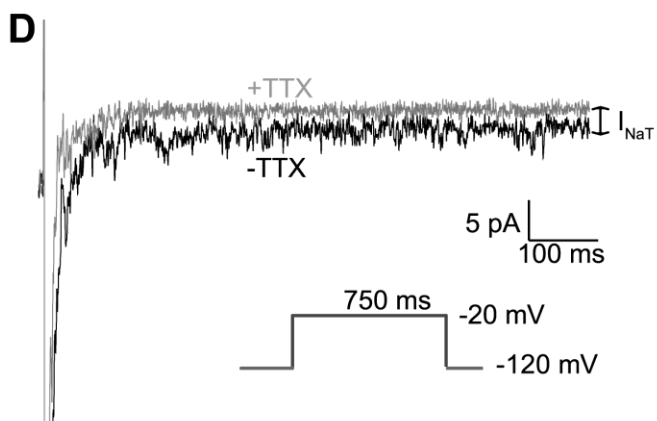
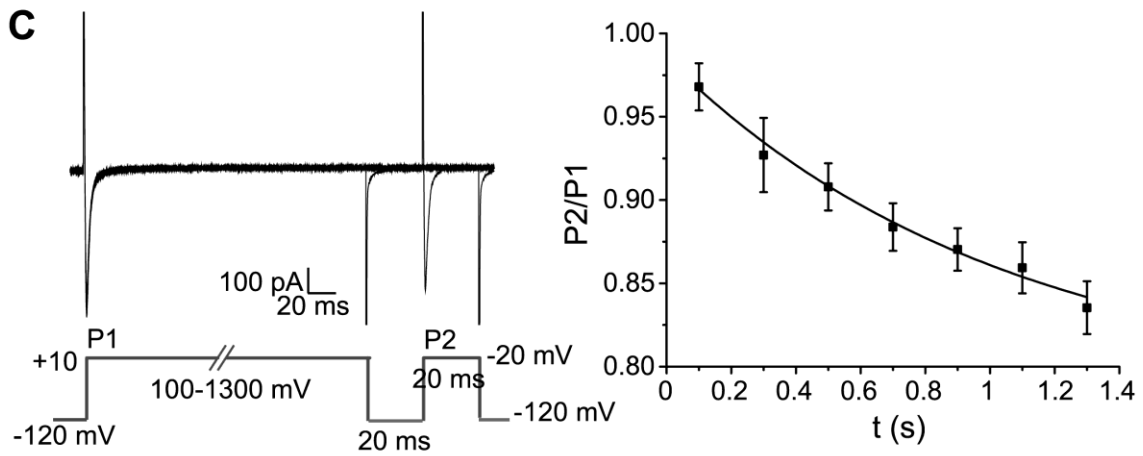
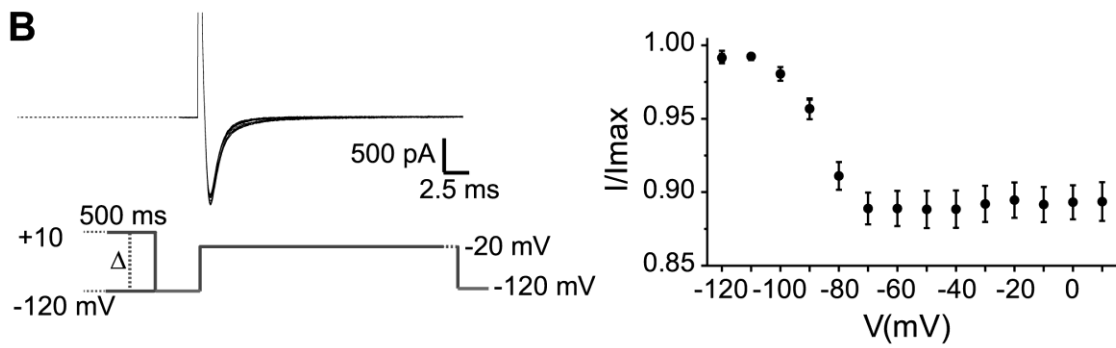
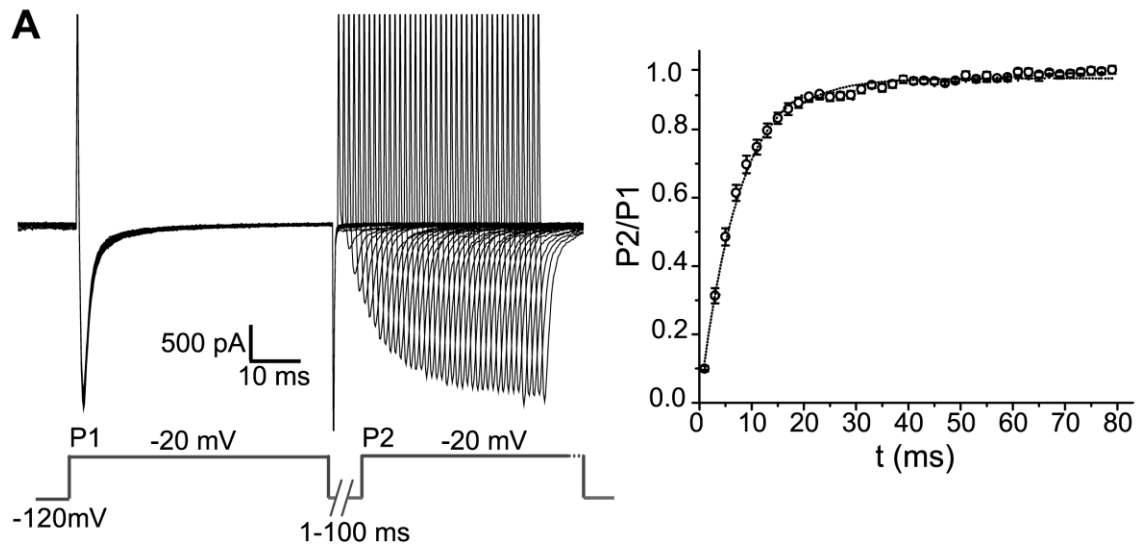
La inactivació tardana o profunda (o *slow inactivation* en anglès) és un estat d'inactivació que succeeix a partir dels 100ms, en què el canal necessita més temps per recuperar-se de la inactivació i més energia per activar-se, comparat amb la inactivació ràpida<sup>102</sup>. Els canals de sodi dependents de voltatge tenen diferents estats d'inactivació més o menys profunds. En funció de en quin estat de profunditat es troba el canal, li serà més fàcil o més difícil recuperar-se per tornar a ser activat. La importància d'aquest estat recau en la fase 2 del PAC, ja que si es troba en un estat poc profund d'inactivació hi poden haver reobertures. A través d'un protocol de doble pols, es pot mesurar la quantitat de canals viables per tornar a ser activats després d'un pols llarg (500 o 1.000ms) a diferents voltatges despolaritzants (Figura 10B); o bé, aplicar un primer pols a un voltatge despolaritzant a diferents durades (de 100 a 1.000ms), per mesurar quant de temps necessiten els canals a un pols de voltatge despolaritzant perquè els canals puguin entrar en inactivació tardana (Figura 10C)<sup>102</sup>.

#### 5.3.5. Corrent de sodi tardà

Com s'ha pogut observar, en condicions fisiològiques els canals de sodi s'obren transitòriament generant el pic de  $I_{Na}$ , com els de la figura 9A, responsable de la despolarització de la fase 0 del PAC, i són ràpidament inactivats. Tot i això, hi ha un percentatge de corrent de sodi que es manté, degut al fet que alguns canals pateixen una inactivació més lenta

o canals que tarden més temps a activar-se. Aquest corrent s'anomena *corrent de sodi tardà* ( $I_{NaT}$ , o *late sodium current*). En condicions fisiològiques, la quantitat de  $I_{NaT}$  en comparació amb el pic de  $I_{Na}$  és molt petit, i per tant un augment de  $I_{NaT}$ , és suficient per generar un substrat patogènic<sup>103,104</sup>. Aprofitant que la  $Na_v1.5$  és resistent a la TTX, però és sensible a concentracions altes, es pot mesurar el  $I_{NaT}$  en comparar el corrent obtingut durant un pols de voltatge despolaritzant molt llarg (750ms) amb o sense TTX (Figura 10D).

**Figura 10 (pàgina següent). Protocols de voltatge i gràfics resultants dels registres de  $I_{Na}$  corresponents a la recuperació de la inactivació, inactivació profunda, i corrent de sodi tardà. A.** Recuperació de la inactivació: a l'esquerra la representació dels corrents macroscòpics obtinguts després d'un protocol de dos polsos, a la dreta, el gràfic resultant de la divisió de P2/P1 a cada temps ajustat a una monoexponencial. **B.** Inactivació tardana en funció de voltatge: a l'esquerra els corrents macroscòpics obtinguts al pols de test després d'un primer pols llarg a diferents voltatges, a la dreta, el gràfic obtingut després de dividir el corrent en el pols de test (I) pel pols amb corrent màxima ( $I_{max}$ ) a voltatge. **C.** Inactivació tardana en funció del temps: a l'esquerra els corrents obtinguts en un pols (P2) després d'un pols despolaritzant de diferents temps de durada (P1), a la dreta, el gràfic resultant de dividir P2/P1 en funció de la durada del P1. **D.** Corrents representatius dels corrents obtinguts a un pols de voltatge despolaritzant (-20 mV) llarg (750 ms) abans i després d'afegir TTX a la solució de bany. La diferència entre el corrent obtingut amb TTX i sense TTX és l'anomenat  $I_{NaT}$ .



## **6. Estructura del canal de sodi cardíac**

Des dels primers registres de corrents cel·lulars per Hodgkin i Huxley, es van començar a definir les propietats dels canals iònics. Amb els estudis biofísics es va descobrir la selectivitat iònica en els porus, es va detectar el moviment dels sensors de voltatge i els corrents iònics, i es van desenvolupar models mecanístics per aquestes propietats<sup>88,105,106</sup>. Més recentment, els estudis d'estructura i funció que utilitzen tècniques moleculars, bioquímiques, estructurals i electrofisiològiques han pogut aportar les bases moleculars i estructurals d'aquestes propietats dels canals iònics<sup>105</sup>.

Si ens centrem en els canals de sodi dependents de voltatge, tal i com s'ha descrit al llarg del capítol 5, podem concloure que tenen tres propietats clau: (1) la dependència de voltatge de l'activació, (2) la inactivació ràpida, i (3) la selectivitat iònica de la conductància.

Els primers canals de sodi purificats de cèl·lules excitable de mamífer van demostrar que els canals eren complexos proteics compostos per una subunitat  $\alpha$  d'uns 260 KiloDaltons (KDa,  $\text{Na}_v\alpha$ ), associada a una o dues subunitats  $\beta$  auxiliars d'aproximadament 33-39 KDa<sup>107,108</sup>, formant uns complexos heterodimèrics o heterotrimèrics amb una o dues subunitats  $\beta$  ( $\text{Na}_v\beta$ )<sup>105,109</sup>.

La posterior expressió de les subunitats  $\text{Na}_v\alpha$  soles en cèl·lules no excitable, va determinar que l'expressió d'aquesta subunitat és suficient per desenvolupar les propietats claus dels canals de sodi dependents de



voltatge<sup>110</sup>. Ara bé, la coexpressió de les  $Na_v\beta$  és essencial per reconstituir les propietats d'aquests canals, ja que diversos estudis demostren que aquestes subunitats modifiquen la cinètica i la dependència de voltatge del  $I_{Na}$ <sup>111</sup>. A més a més, també s'han publicat altres proteïnes que interaccionen amb el canal amb diferents funcions d'ancoratge, moduladores i/o reguladores, necessàries també per a l'obtenció de canals funcionals a la membrana<sup>112</sup>.

S'han descrit múltiples gens que formen les subunitats  $\alpha$  i  $\beta$  dels canals de sodi dependents de voltatge. Aquests gens formen diferents subtipus de  $Na_v\alpha$  i  $Na_v\beta$ , amb subtils diferències en les propietats funcionals i en la distribució i expressió entre els teixits<sup>105</sup>.

A continuació, es profunditzarà en l'estructura molecular i funció de les subunitats  $Na_v\alpha$  i  $Na_v\beta$ , els gens que codifiquen per aquestes subunitats, i els altres factors involucrats en obtenir canals funcionals a la membrana.

## **6.1. Gens, estructura molecular i funció de les subunitats $\alpha$ que formen els canals de sodi dependents de voltatge**

### **6.1.1. Gens que codifiquen per les diferents $Na_v\alpha$**

S'han caracteritzat diferents canals de sodi dependents de voltatge. Aquests són similars en les característiques funcionals amb petites diferències en algunes de les propietats que permeten distingir les diferents isoformes, cada una especialitzada en el seu rol fisiològic i farmacològic.

Els canals de sodi depenent de voltatge dels vertebrats, sobretot d'humà i de rosegadors, són els més ben caracteritzats molecularment. S'han caracteritzat nou subunitats  $\alpha$  diferents del canal de sodi depenent de voltatge ( $Na_v1.1 - 1.9$ ) en diferents teixits excitable i són codificades per 9 gens diferents<sup>105,113</sup>.

La seqüència d'aminoàcids de les nou  $Na_v\alpha$  és més d'un 50% idèntica entre elles, és per això que són considerades part d'una mateixa família de  $Na_v\alpha$ , l'anomenada família  $Na_v1$  (Figura 11A i Taula 6)<sup>105,113,114</sup>. També s'ha descrit un desè canal de sodi ( $Na_x$ ), codificat pels gens *SCN6A* i *SCN7A*, però la seqüència d'aminoàcids és molt més divergent, amb diferències en regions importants pel funcionament i la dependència de voltatge del canal, la qual cosa suggereix que aquest canal forma part d'una segona família de canals de sodi ( $Na_v2$ )<sup>114</sup>.

Els gens que codifiquen per les 9 subunitats  $\alpha$  de la família  $Na_v1$  es poden dividir en quatre clústers filogenètics corresponents al segment cromosomal a on es troben (Figura 11B i Taula 6)<sup>105,113,114</sup>:

Els gens que codifiquen per les  $Na_v1.1$ ,  $Na_v1.2$ ,  $Na_v1.3$  i  $Na_v1.7$  es troben tots localitzats en el cromosoma humà 2 (*SCN1A*, *SCN2A*, *SCN3A* i *SCN9A*, respectivament. Taula 6). Les quatre subunitats són molt similars en seqüència (Figura 11A) i en les característiques biofísiques, totes quatre són sensibles a la TTX i s'expressen en neurones.

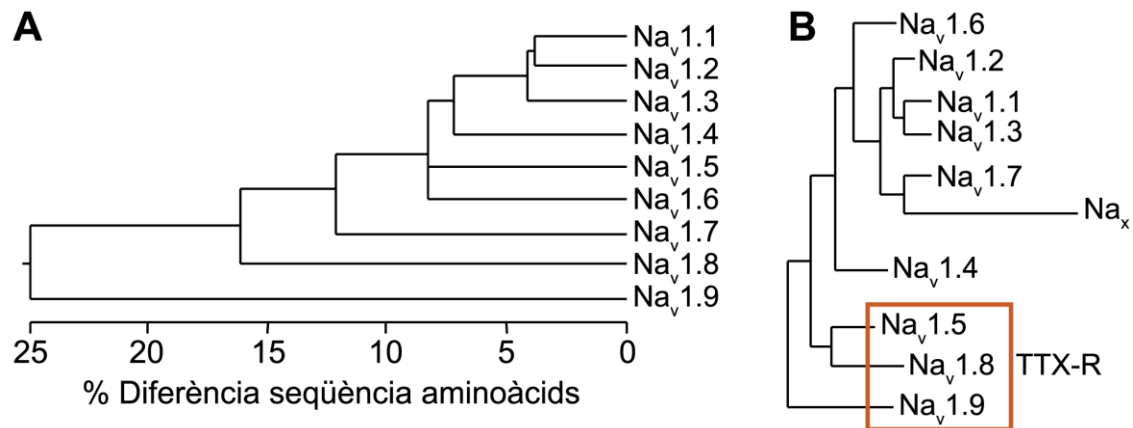
El segon clúster de gens que codifiquen per canals de sodi són els que codifiquen per  $Na_v1.5$ ,  $Na_v1.8$  i  $Na_v1.9$  (*SCN5A*, *SCN10A* i *SCN11A*,

respectivament), i es troben localitzats al cromosoma humà 3 (Taula 6). Aquestes tres subunitats són el 75% idèntiques respecte als gens del clúster del cromosoma 2 (Figura 11A). Ara bé, aquestes tres subunitats són resistents, en diferents graus, a la TTX. La subunitat  $Na_v1.5$  s'expressa de manera majoritària en el cor, i els canals  $Na_v1.8$  i  $Na_v1.9$  s'expressen majoritàriament en les neurones sensorials perifèriques.

Les dues isoformes restants, es localitzen en dos cromosomes diferents, el  $Na_v1.4$  al cromosoma humà 17q23-25 i el  $Na_v1.6$  al cromosoma humà 12q13 (Taula 6). La  $Na_v1.4$  és codificada pel gen *SCN4A* (expressada en múscul esquelètic) i la  $Na_v1.6$  és codificada pel gen *SCN8A* (molt abundant en el sistema nerviós central), tenen el 85% de similitud amb les isoformes del cromosoma 2 (Figura 11A), incloent la sensibilitat a la TTX.

Subunitat $\alpha$	Gen	Localització cromosòmica
$Na_v1.1$	<i>SCN1A</i>	2q24
$Na_v1.2$	<i>SCN2A</i>	2q23-24
$Na_v1.3$	<i>SCN3A</i>	2q24
$Na_v1.4$	<i>SCN4A</i>	17q23-25
$Na_v1.5$	<i>SCN5A</i>	3p21
$Na_v1.6$	<i>SCN8A</i>	12q13
$Na_v1.7$	<i>SCN9A</i>	2q24
$Na_v1.8$	<i>SCN10A</i>	3p22-24
$Na_v1.9$	<i>SCN11A</i>	3p21-24
$Na_x$	<i>SCN6A-7A</i>	2q21-23

**Taula 6. Subunitats  $\alpha$  dels canal de sodi dependents de voltatge.** Símbols de la proteïna, gens i localització cromosòmica d'acord a la nomenclatura en humans.



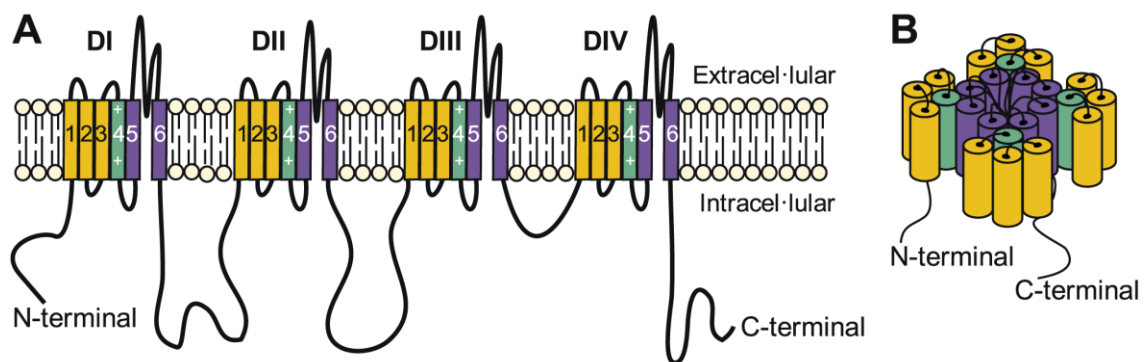
**Figura 11. Relació filogenètica entre els diferents canals de sodi dependents de voltatge**<sup>113,114</sup>. **A.** Comparació aminoacídica dels canals Na<sub>v</sub>1.1-9 de rata<sup>113</sup>. **B.** Relació filogenètica utilitzant l'anàlisi amb la màxima parsimònia de les seqüències dels canals de rata Na<sub>v</sub>1.1-1.9 i el Na<sub>x</sub>. TTX-R significa resistent a la tetrodotoxina.

### 6.1.2. Estructura molecular i funció les subunitats Na<sub>v</sub>α

En general, tots els canals iònics dependents de voltatge tenen una arquitectura similar, que consisteix en un mòdul central que forma el porus conductor dels ions, i quatre mòduls perifèrics sensors de voltatge. En mamífer, les subunitats α dels canals de potassi dependents de voltatge són homotetràmers de quatre subunitats homòlogues, mentre que les subunitats α de calci i sodi són tetràmers constituïts per una sola proteïna amb 4 dominis homòlegs connectats entre ells per uns llargs llaços intracel·lulars<sup>106</sup>.

Posant el focus a la Na<sub>v</sub>α, la predicció de la proteïna — a través de la seqüència aminoacídica i assajos d'hidrofobicitat, bioquímics, estructurals i electrofisiològics — és que cada domini està format per 6 segments α-hèlix transmembrana (S1-S6) connectats entre si per llaços intracel·lulars i extracel·lulars intercalats. Els dominis N- i C- terminals són

intracel·lulars. A cada domini, els segments del S1 al S4 serveixen com a mòdul sensor de voltatge. Els segments S5, els S6, i els llaços que uneixen els dos segments (llaç P) dels 4 dominis, formen el mòdul que constitueix el porus del canal (Figura 12A). La predicció de l'estructura tetramèrica consisteix en què els quatre dominis es pleguen formant el porus, folrat pels llaços que es formen entre el segment S5 i S6 de cada domini que reentren a la regió transmembrana per formar el filtre iònic selectiu a l'extrem extracel·lular del porus<sup>105,106</sup> (Figura 12B).



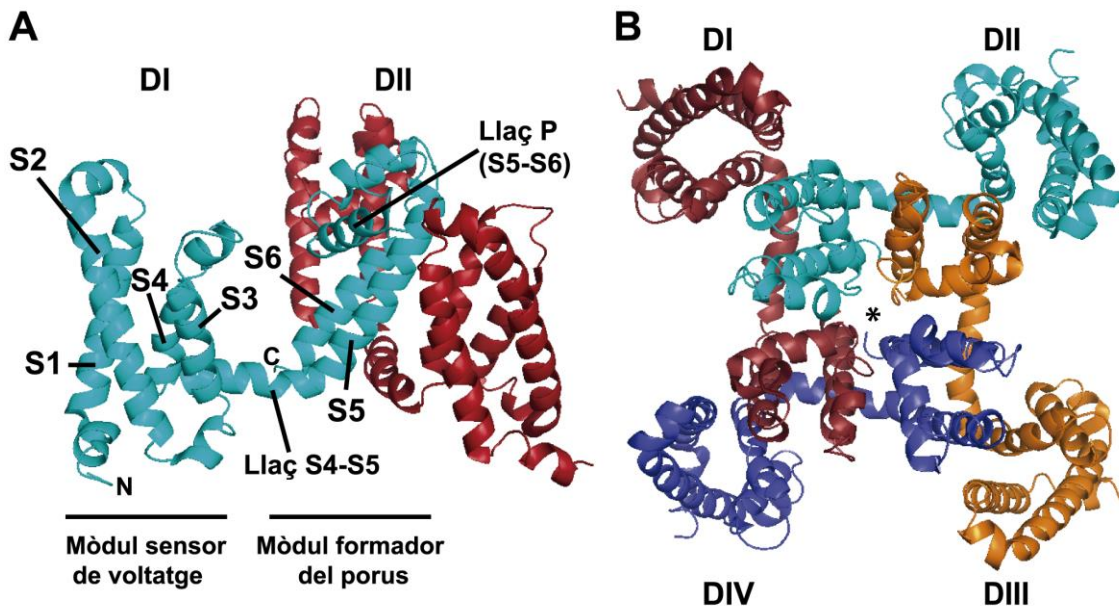
**Figura 12. Estructura de les subunitats  $\alpha$  dels canals de sodi dependents de voltatge.** **A.** Representació esquemàtica de l'estructura primària de la subunitat  $\alpha$  dels canals de sodi dependents de voltatge. **B.** Representació esquemàtica de l'estructura quaternària predita de la proteïna. La proteïna envolta el porus folrat pels llaços entre els segments S5 i S6.

El 2012, es va determinar per primera vegada l'estructura d'un canal de sodi dependent de voltatge després d'obtenir cristal·litzat a alta resolució el canal de sodi del bacteri *Arcobacter butzleri* ( $\text{Na}_v\text{Ab}$ )<sup>115</sup> i la regió del porus conductor en estat obert del bacteri *Magnetococcus* ( $\text{Na}_v\text{M}$ )<sup>116</sup>. Aquesta estructura primitiva està formada per la unió de 4 monòmers

idèntics, igual que els canals de potassi dependents de voltatge de mamífer, cada un equivalent a un dels dominis homòlegs de la  $Na_v\alpha$  de mamífer però sense els llaços intracel·lulars i extracel·lulars<sup>115</sup>. La figura 13A és la representació d'un dels dímers cristal·litzat, a on en blau es pot observar l'estructura del mòdul sensor de voltatge d'un monòmer (segments S1-S4), i el mòdul que forma el porus (el llaç entre els segments S5-S6 i els segment S5-S6); i al fons el segon monòmer en vermell. Es pot observar també que els monòmers es troben intercalats, de manera que el mòdul que forma el porus està posicionat al costat del mòdul sensor de voltatge de la subunitat veïna (en vermell).

A la figura 13B es pot observar una duplicació simètrica del dímer, obtenint una representació del tetràmer que configurarien els 4 monòmers. Com es pot observar, el porus és central envoltat pels 4 mòduls formadors del porus, i els 4 mòduls sensors de voltatge es troben posicionats simètricament al voltant dels mòduls que formen porus.

En els estudis de mutacions que poden afectar la funció del canal, és important entendre la relació entre la seva estructura i com les diferents conformacions que la proteïna pot adoptar li atorguen les propietats biofísiques característiques. Com s'ha mencionat anteriorment, l'estructura dels canals de sodi dependents de voltatge es va predir en base a la seqüència primària de la proteïna, assajos bioquímics i electrofisiològics, però els estudis recents de cristal·lografia han permès



**Figura 13. Estructura cristal·litzada de  $\text{Na}_v\text{Ab}$ .** **A.** Representació d'un dímer de  $\text{Na}_v\text{Ab}$ . Un monòmer es troba marcat amb blau i l'altre en vermell. Es marquen del monòmer blau els segments S1-S6, el llaç citoplasmàtic entre els segments S4 i S5, i el llaç que forma el mòdul del porus amb S5 i S6 (llaç P). **B.** Representació d'un tetràmer obtingut en duplicar de manera simètrica el dímer. S'observa com els mòduls formadors del porus formen la cavitat del porus (porus assenyalat amb un asterisc \*), i els 4 mòduls sensors de voltatge es troben perifèrics a aquests mòduls centrals. Ambdues figures s'han obtingut a través de la importació de l'estructura proteica publicada per Payandeh *et al.* al Protein Data Base (PDB, referència #4EKW), al programa Pymol.

avançar en el coneixement de les propietats biofísiques del canal com la selectivitat iònica, la dependència de voltatge de l'activació, i la inactivació, i han obert la porta a comprendre i predir la possible patogenicitat d'una determinada mutació<sup>105,106,115,116</sup>. Ara bé, encara cal dilucidar molts detalls de l'estructura, tant de la subunitats  $\text{Na}_v\alpha$  com de les  $\text{Na}_v\beta$ , per entendre, entre altres coses, la interacció entre les dues.

Com que els estudis funcionals presentats en aquesta tesi estan relacionats amb les mutacions a les subunitats  $\text{Na}_v\beta$ , no es profunditzarà més en la subunitat  $\text{Na}_v\alpha$  i a continuació es descriuen breument les diferents  $\text{Na}_v\beta$ , i el estudis realitzats per la determinació de les estructures moleculars d'aquestes subunitats i la modulació biofísica dels  $\text{Na}_v\beta$  en relació a la funció de les diferents  $\text{Na}_v\alpha$ .

## **6.2. Gens, estructura molecular i funció de les subunitats $\beta$ que formen els canals de sodi dependents de voltatge**

### **6.2.1. Gens que codifiquen per les diferents subunitats $\text{Na}_v\beta$**

Fins al dia d'avui, s'han identificat cinc subunitats  $\beta$  del canal de sodi dependent de voltatge ( $\text{Na}_v\beta$ ):  $\text{Na}_v\beta 1$ <sup>107,117</sup>,  $\text{Na}_v\beta 1b$ <sup>118,119</sup> (variant de *splicing* de la  $\beta 1$ ),  $\text{Na}_v\beta 2$ <sup>108,120,121</sup>,  $\text{Na}_v\beta 3$ <sup>122</sup>, i  $\text{Na}_v\beta 4$ <sup>123</sup>. Les cinc subunitats estan codificades per quatre gens: *SCN1B* (per les dues isoformes de les  $\beta 1$ ), *SCN2B*, *SCN3B*, i *SCN4B*, respectivament.

Diversos estudis demostren que  $\text{Na}_v\beta$  interaccionen amb les diferents subunitats  $\text{Na}_v\alpha$ , i s'expressen en diferents tipus cel·lulars<sup>111</sup>. En general, s'observa que les  $\text{Na}_v\alpha$  estan associades a les subunitats  $\text{Na}_v\beta 1$  i  $\text{Na}_v\beta 3$  per enllaços no covalents<sup>107,108,122</sup>, i a les subunitats  $\text{Na}_v\beta 2$  i  $\text{Na}_v\beta 4$  per ponts disulfur<sup>107,123</sup>. Tot i que poden existir altres tipus d'interaccions ja que la ruptura del llaç disulfur de  $\text{Na}_v\beta 2$  i  $\text{Na}_v\beta 4$  amb  $\text{Na}_v 1.5$  i  $\text{Na}_v 1.2$ , respectivament, no anul·la del tot la interacció entre les dues subunitats<sup>124,125</sup>.



Mutacions en els gens que codifiquen per aquestes proteïnes, s'han implicat en el desenvolupament de diferents malalties: epilèpsia, alteració de la resposta al dolor, malaltia de Huntington, arítmies cardíaques i MSC, entre d'altres<sup>111</sup>. Aquest fet suggereix que aquestes  $\text{Na}_v\beta$  tenen un paper important en l'excitabilitat cel·lular i per tant en les malalties relacionades en la regulació d'aquesta excitabilitat.

### 6.2.2. Estructura molecular i funció de les subunitats $\text{Na}_v\beta$

Les  $\text{Na}_v\beta$  estan formades per un llarg domini extracel·lular amb una seqüència de reconeixement peptídica seguida d'una seqüència tipus immunoglobulina (formant part de la superfamília de les immunoglobulines)<sup>126</sup>, un únic segment transmembrana i una cua citoplasmàtica curta<sup>111</sup> (Figura 14A). Tot i que aquesta és l'estructura que comparteixen totes les  $\text{Na}_v\beta$ , assajos d'hidrofobicitat suggereixen que possiblement la  $\text{Na}_v\beta 1b$  és la única subunitat que no és transmembranal i és secretada<sup>127,128</sup>.

Recentment, s'ha pogut obtenir l'estructura del domini extracel·lular de les subunitats  $\text{Na}_v\beta 3$ <sup>129</sup> i  $\text{Na}_v\beta 4$ <sup>124</sup> a través de cristal·lografia (Figura 14 B i C, respectivament).

Sorprenentment, en l'estudi de Namadurai es va cristal·litzar la  $\text{Na}_v\beta 3$  en forma de trímer, i demostren que la  $\text{Na}_v\beta 3$  pot formar monòmers, dímers i trímers, a través d'un enllaç disulfur entre dues cisteïnes de la mateixa subunitat (Cys2-Cys24), que exposarien els aminoàcids clau per poder oligomeritzar-se. A més a més, l'estudi demostra que la  $\text{Na}_v\beta 3$  pot

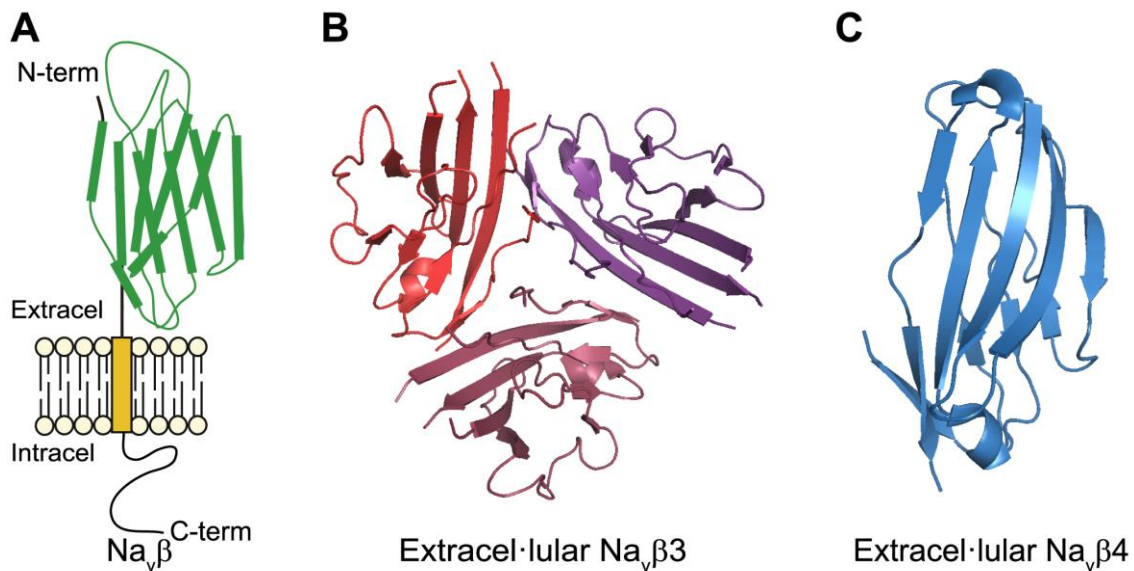
interaccionar per diversos llocs a la vegada amb la  $Na_v\alpha$ , potenciant interaccions oligomèriques entre subunitats  $Na_v\alpha$  a través de les  $Na_v\beta3$ . En l'estudi postulen per similitud aminoacídica, que la subunitat  $Na_v\beta1$  també podria formar dímers i trímers i promoure l'oligomerització de les  $Na_v\alpha$ , com han suggerit altres estudis<sup>130</sup>.

Per contra, a l'estudi de cristal·lització de la subunitat  $Na_v\beta4$ , s'observa que el domini extracel·lular de la  $Na_v\beta4$  es troba en forma monomèrica<sup>124</sup>. S'estableix, també, que la Cys58 (equivalent a la Cys24 de la subunitat  $Na_v\beta3$  de l'estudi anterior o a la Cys26 de la  $Na_v\beta2$  de l'estudi Chen (2012)<sup>125</sup>) és la cisteïna que formaria el pont disulfur amb les  $Na_v\alpha$ .

D'altra banda, la  $Na_v\beta2$  i la  $Na_v\beta4$  no tenen la cisteïna equivalent a la Cys2 de la  $Na_v\beta3$ , per tant tot indica que les cisteïnes  $Na_v\beta4$ -Cys58 o  $Na_v\beta2$ -Cys26 formen l'enllaç disulfur amb la  $Na_v\alpha$  i no formen un pont disulfur entre la mateixa subunitat  $Na_v\beta$  per absència de la Cys2 equivalent. Aquesta diferència provocaria que no es donin les condicions estructurals necessàries per establir oligòmers entre les mateixes  $Na_v\beta2$  i les  $Na_v\beta4$ , i que aquestes subunitats tampoc puguin promoure l'oligomerització entre subunitats  $Na_v\alpha$ . Aquest fet indicaria diferències importants en el rol de les subunitats  $Na_v\beta1/\beta3$ , i les  $Na_v\beta2/\beta4$ .

Les  $Na_v\beta$  s'expressen majoritàriament en cèl·lules excitable (neurons centrals i perifèriques, cèl·lules musculars i cardíques), però també s'expressen en cèl·lules no excitable (glia, cèl·lules endotelials vasculars, carcinoma i cèl·lules mare)<sup>111</sup>. En alguns teixits, hi ha

evidències que suggereixen que les  $\text{Na}_v\beta$  es poden expressar sense la presència de la  $\text{Na}_v\alpha$ . Aquest fet, juntament amb la similitud d'aquestes proteïnes a altres proteïnes de la família de les immunoglobulines, suggereix que a part de tenir una funció en la regulació i modulació de les  $\text{Na}_v\alpha$ , tenen una funció no conductora com la d'adhesió i migració cel·lular<sup>106,111,128</sup>.



**Figura 14. Estructura de les subunitats  $\beta$  dels canals de sodi dependents de voltatge.** **A.** Representació esquemàtica predita a partir de les seqüències aminoacídiques de les diferents subunitats  $\text{Na}_v\beta$ . En verd, es pinta el domini tipus immunoglobulina. **B.** Representació de l'estructura cristal·litzada del domini extracel·lular de la  $\text{Na}_v\beta3$  formant un trímer. Els diferents monòmers es poden observar pintats en diferents tonalitats de vermell. **C.** Representació de l'estructura cristal·litzada del domini extracel·lular de la  $\text{Na}_v\beta4$  en forma de monòmer. **B i C.** Ambdues figures s'han obtingut a través de la importació de l'estructura proteica publicada per Namadurai i Gilchrist, respectivament, del PDB al Pymol (PDB #4L1D i #4MZ2, respectivament).

En conjunt, les  $\text{Na}_v\beta$  tenen una elevada importància en l'excitabilitat cel·lular i les malalties relacionades en la regulació d'aquesta excitabilitat.. Aquest apartat se centra en la seva regulació i modulació sobre la subunitat  $\alpha$   $\text{Na}_v1.5$  i la seva implicació en les arítmies cardíaques hereditàries (Taula 7).

### **Subunitat $\text{Na}_v\beta1a$**

El gen *SCN1B* es troba situat al cromosoma humà 19 (19q13.12). Codifica per la subunitats  $\text{Na}_v\beta1a$  i una variant de *splicing* alternativa,  $\text{Na}_v\beta1b$ . Els exons de l'1 al 5 del gen, codifiquen la subunitat  $\text{Na}_v\beta1a$  de 218 aminoàcids (Figura 15). Aquesta subunitat s'expressa en cor<sup>131-134</sup> i coimmunoprecipita amb la  $\text{Na}_v1.5$ <sup>132</sup>.

S'ha determinat que el domini extracel·lular de subunitat  $\text{Na}_v\beta1a$  interacciona amb el llaç entre els segments S5 i S6 dels dominis I i IV de la  $\text{Na}_v1.5$ <sup>132,135,136</sup>. Així mateix, s'ha identificat que el domini C-terminal de la  $\text{Na}_v1.1$  interacciona amb el C-terminal de la  $\text{Na}_v\beta1a$ <sup>137</sup>, i que una deleció completa del domini C-terminal de la  $\text{Na}_v\beta1a$  altera la interacció de la  $\text{Na}_v\beta1a$  amb la  $\text{Na}_v1.2$ <sup>138</sup>. Per tant, aquests estudis posen de manifest també la importància d'aquest en el domini C-terminal de la  $\text{Na}_v\beta1a$  en la interacció amb les subunitats  $\text{Na}_v\alpha$ .

Els experiments que s'utilitzen sistemes d'expressió heteròloga demostren diversos efectes de la  $\text{Na}_v\beta1a$  a les  $\text{Na}_v\alpha$ . La propietat més consensuada és que incrementa l'amplitud de  $I_{\text{Na}}$ <sup>92,93,102,131,139-142</sup>, possiblement degut al fet que la presència de la subunitat incrementa la

quantitat de  $Na_v\alpha$  de la superfície cel·lular<sup>93,131</sup>. Aquests estudis també demostren que pot afectar a altres propietats biofísiques del canal, com l'activació i inactivació depenent de voltatge, recuperació de la inactivació, el corrent de sodi tardà ( $I_{NaT}$ ) i la inactivació profunda.

Els estudis de la patogenicitat de mutacions en aquest gen en relació a la  $Na_v1.5$  són diversos. Mutacions en els exons que codifiquen per la  $Na_v\beta1a$  s'han associat a arítmies cardíques hereditàries amb alt risc de MSC: dues mutacions responsables de FAF en dues famílies no relacionades [*SCN1B* p.(Arg85His) i p.(Asp153Asn)]<sup>92</sup>; i una mutació responsable de SBr i/o SPCC en una família [*SCN1B* p.(Glu87Gln)]<sup>141</sup> (Taula 7).

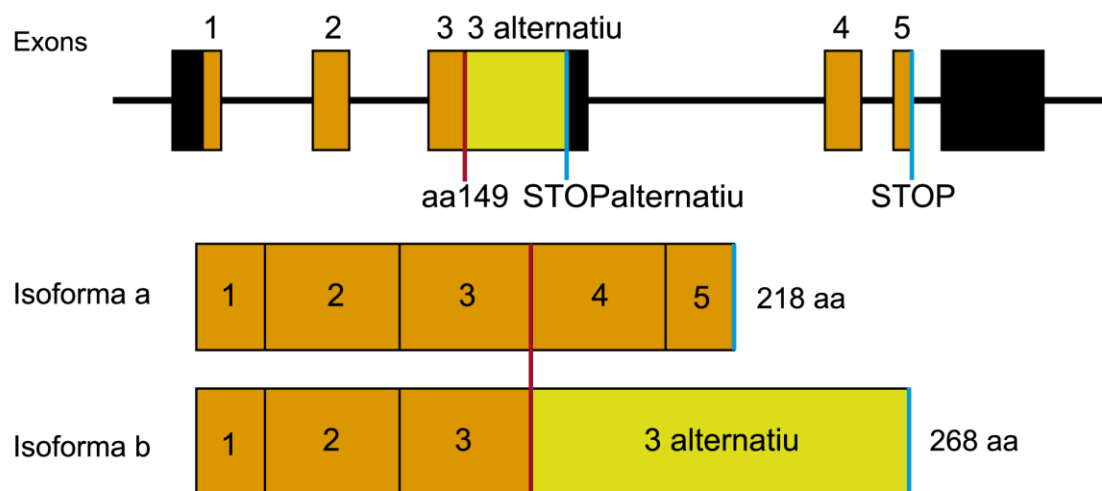
### **Subunitat $Na_v\beta1b$**

La subunitat  $Na_v\beta1b$  és un *splicing* alternatiu del gen *SCN1B* (també anomenat *SCN1Bb* per aquesta variant). L'intró 3-4 es codifica fins a un codó stop alternatiu, que impedeix la codificació de l'exó 4 i 5. En conseqüència, les subunitats  $Na_v\beta1a$  i  $Na_v\beta1b$  són idèntiques fins a l'aminoàcid 149, i a partir de l'aminoàcid 150, el C-terminal de les subunitats  $Na_v\beta1a$  i  $Na_v\beta1b$  són diferents. El C-terminal alternatiu és més llarg que el de la  $Na_v\beta1a$ , i fa que la proteïna de la subunitat  $Na_v\beta1b$  sigui més llarga (268 aminoàcids respecte als 218 de la  $Na_v\beta1a$ , Figura 15)<sup>118,119</sup>.

Aquesta subunitat s'expressa en teixit amb un patró molt similar a la  $Na_v\beta1a$ , en elevades quantitats en cervell i múscul esquelètic i en

quantitats menors en cor, placenta, pulmó, fetge, ronyons i pàncrees<sup>119</sup>. En el cor humà, la subunitat  $Na_v\beta 1b$  s'expressa en el ventricle dret i esquerre, a les aurícules i en les fibres de *purkinje*<sup>141,143</sup>. Estudis recents, han observat que aquesta subunitat està ancorada a la superfície cel·lular quan es coexpressa amb la subunitat  $Na_v1.5$ <sup>127,144</sup>, però no amb les altres subunitats  $\alpha$  estudiades ( $Na_v1.1$  i  $Na_v1.3$ ), per tant suggereixen una interacció específica amb algunes  $Na_v\alpha$ <sup>127</sup>.

### SCN1B



**Figura 15. Representació de les dues variants d'*splicing* del gen *SCN1B*.** La isoforma a que codifica per la  $\beta 1a$  de 218 aminoàcids està formada pels exons 1, 2, 3, 4 i 5. Mentre que la isoforma b, que codifica per la  $\beta 1b$  de 268 aminoàcids, està formada pels exons 1,2,3 i part de l'intró 3-4 a on es troba un codó stop alternatiu.

Els estudis de caracterització funcional de la subunitat  $Na_v\beta 1b$ , fins a dia d'avui, determinen que la subunitat  $\beta 1b$  incrementa la densitat del  $I_{Na}$  de la  $Na_v1.5$ <sup>141,144</sup>, de  $Na_v1.2$ <sup>118</sup> i de  $Na_v1.3$ <sup>127</sup>. Així com amb aquest afecte té el suport de la majoria d'articles, existeixen controvèrsies en les evidències presentades de l'afectació de la  $Na_v\beta 1b$  a les altres propietats

biofísiques de la  $Na_v1.5$ . Aquestes controvèrsies es mencionen detalladament a la discussió associada als resultats del segon article que es presenta en aquesta tesi.

L'efecte patogènic d'aquesta subunitat s'ha estudiat a partir de tres mutacions trobades a l'exó 3 alternatiu: la mutació *SCN1Bb* p.(Thr179\*) responsable de SBr i/o SPCC en dues famílies no relacionades<sup>141</sup>; la mutació *SCN1Bb* p.(Arg214Gln) responsable de SBr i MSL, en tres famílies no relacionades<sup>144</sup>, i la mutació *SCN1Bb* p.(His162Pro) en un pacient amb SBr<sup>143</sup> (Taula 7).

### **Subunitat $\beta 2$**

El gen *SCN2B* situat al cromosoma humà 11 (11q23.3), està format per 4 exons que codifiquen per la  $Na_v\beta 2$  del canal de sodi cardíac de 215 aminoàcids. La subunitat  $Na_v\beta 2$  interacciona amb el canal de sodi per ponts disulfur<sup>107,123</sup>, però també hi ha evidències d'interaccions no covalents<sup>125</sup>, possiblement a través del domini C-terminal<sup>145</sup>.

S'ha determinat que aquesta subunitat coimmunoprecipita amb la subunitat  $Na_v1.5$ <sup>132</sup>, i que s'expressa en els discs intercalars dels cardiomiòcids, i colocalitza amb la subunitat  $Na_v1.5$ <sup>132,134</sup>.

La coexpressió de la  $Na_v\beta 2$  amb diferents  $Na_v\alpha$  en sistemes d'expressió heteròloga, majoritàriament demostren que la  $Na_v\beta 2$  no té un efecte en la densitat del  $I_{Na}$ <sup>92,125,132,146</sup>. No obstant això, l'efecte de la  $Na_v\beta 2$  a la dependència de voltatge del canal està en controvèrsia, i les divergències van des de la manca d'efecte<sup>125,132,146</sup>, fins a desviacions de la

dependència de voltatge de l'activació i/o de la inactivació a potencials més negatius<sup>120,146</sup> o més positius<sup>92,146,147</sup>.

La possible explicació d'aquestes controvèrsies, a banda de les possibles diferències en funció de la subunitat  $Na_v\alpha$  estudiada, recau en el fet que l'efecte de la  $Na_v\beta 2$  depèn de les modificacions posttraduccional, en particular la sialització<sup>146</sup>.

Finalment, també s'ha demostrat que, a diferència de la  $Na_v\beta 1$ , la subunitat  $Na_v\beta 2$  interacciona directament amb la  $Na_v 1.5$  a la membrana plasmàtica sense tenir cap efecte en el trànsit d'aquesta proteïna<sup>93</sup>.

Aquests estudis coincideixen amb els estudis fets amb la subunitat  $\alpha$   $Na_v 1.7$ , els quals postulen que les subunitats  $Na_v\beta 1$  i  $Na_v\beta 3$  interaccionen amb la  $Na_v 1.7$  abans d'arribar al Golgi, però en canvi les subunitats  $Na_v\beta 2$  i  $Na_v\beta 4$  hi interaccionen directament a la membrana plasmàtica<sup>148</sup>.

Fins al moment, només s'han identificat dues mutacions al gen *SCN2B* [*SCN2B* p.(Arg28Trp), p.(Arg28Gln)] relacionades a FAF<sup>92</sup> (Taula 7).

### **Subunitat $\beta 3$**

La subunitat  $Na_v\beta 3$ , de 215 aminoàcids, està codificada pels 5 exons que conformen gen *SCN3B* localitzat en el cromosoma 11 humà (11q24.1). Aquesta subunitat, s'expressa en teixit ventricular, auricular i fibres de *purkinje*<sup>139,149,150</sup>. Els estudis també demostren que la  $Na_v\beta 3$  coimmunoprecipita amb la  $Na_v 1.5$ <sup>151,152</sup>.



Igual que les altres subunitats  $\text{Na}_v\beta$ , diferents estudis demostren que modula i regula diferents propietats biofísiques de la subunitat  $\alpha$   $\text{Na}_v1.5$ <sup>139,147,150-155</sup>. Tot i això, hi ha divergència en els resultats observats. Un estudi amb ratolins *knock-out* (KO) de la  $\text{Na}_v\beta3$  va revelar que una deficiència d'aquesta subunitat provocava anomalies electrofisiològiques ventriculars. L'anàlisi electrofisiològica dels miòcits d'aquests ratolins van demostrar que l'absència de la  $\text{Na}_v\beta3$  reduïa significativament el  $I_{\text{Na}}$  i alterava la inactivació dependent de voltatge<sup>156</sup>.

D'altra banda, mutacions a la subunitat  $\text{Na}_v\beta3$  també s'han associat a malalties elèctriques cardíques: dues mutacions s'han associat com a responsables de SBr en quatre famílies diferents no relacionades, una família amb la mutació *SCN3B* p.(Leu10Pro)<sup>150</sup>, i tres famílies amb la mutació *SCN3B* p.(Val110Pro)<sup>151</sup>; la mutació *SCN3B* p.(Val54Gly) s'ha relacionat amb TV idiopàtica<sup>152</sup> i MSL<sup>157</sup> en dues famílies no relacionades; l'altra mutació *SCN3B* p.(Val36Met) també s'ha relacionat a MSL<sup>157</sup>; i finalment, 4 mutacions s'han associat a FAF [*SCN3B* p.(Arg6Lys), p.(Leu10Pro) p.(Asp103Val) i p.(Met161Thr)] en quatre famílies no relacionades<sup>149,153</sup> (Taula 7).

### **Subunitat $\beta4$**

La subunitat  $\text{Na}_v\beta4$ , de 228 aminoàcids, està codificada pel gen *SCN4B* localitzat al cromosoma 11 humà (11q23.3) de 5 exons. Aquesta subunitat també coimmunoprecipita amb la subunitat  $\text{Na}_v1.5$ <sup>158</sup>,

s'expressa en cor<sup>123,159</sup> i en els cardiomiòcits es localitza en els discs intercalars<sup>133,134</sup>.

Estudis en sistemes d'expressió heteròloga demostren que la Na<sub>v</sub>β4 no afecta l'amplitud del corrent igual que la Na<sub>v</sub>β2, però modula la cinètica d'inactivació<sup>157,158</sup>.

Finalment, les mutacions *SCN4B* p.(Leu179Phe)<sup>158</sup> i p.(Ala220Thr)<sup>51</sup> s'han associat a SQTL, les mutacions *SCN4B* p.(Val161Gly) i p.(Ile166Leu) a FAF<sup>160</sup>, i la mutació *SCN4B* p.(Ser206Leu) a MSL<sup>157</sup> (Taula 7).

Subunitat Na <sub>v</sub> β	Gen codificant	Efectes en la localització de Na <sub>v</sub> 1.5	Efectes en les propietats biofísiques de Na <sub>v</sub> 1.5	Canalopatia cardíaca relacionada
Na <sub>v</sub> β1	<i>SCN1B</i>	Llaç S5-S6 del DI i DIV, rol en l'expressió a la superfície cel·lular	Augment I <sub>Na</sub> , modulació de les propietats biofísiques i modulació del trànsit a la superfície cel·lular.	FAF, SBr i SPCC
Na <sub>v</sub> β1b	<i>SCN1B</i> variant <i>splicing</i>	Lloc d'interacció nd, possible rol en l'expressió a la superfície cel·lular	Augment I <sub>Na</sub> i modulació de les propietats biofísiques.	SPCC, SBr i MSL
Na <sub>v</sub> β2	<i>SCN2B</i>	Lloc d'interacció nd, possible rol en l'ancoratge a la superfície cel·lular	Modulació de les propietats biofísiques.	FAF
Na <sub>v</sub> β3	<i>SCN3B</i>	Lloc d'interacció nd, possible rol en l'expressió a la superfície cel·lular	Alteració del I <sub>Na</sub> , modulació de les propietats biofísiques, i modulació del trànsit a la superfície cel·lular.	SBr, TV idiopàtica, FAF i MSL
Na <sub>v</sub> β4	<i>SCN4B</i>	Lloc d'interacció nd, possible rol en l'ancoratge a la superfície cel·lular	Modulació de les propietats biofísiques.	SQTL, FAF i MSL

**Taula 7. Modulació i fenotips clínics associats a la interacció de les Na<sub>v</sub>β amb la Na<sub>v</sub>1.5.**

### **6.3. Altres factors moleculars que intervenen en l'obtenció d'un canal funcional a la membrana**

Igual que altres proteïnes de membrana, després de la seva transcripció la subunitat Na<sub>v</sub>1.5 és transportada fins a la membrana plasmàtica i rep tota una sèrie de modificacions posttranscripcionals. Durant el transport de la Na<sub>v</sub>1.5 del RE a la superfície cel·lular, la proteïna és glicosilada, fosforilada, i metilada, s'ancora al citoesquelet, s'emmagatzema a diferents compartiments cel·lulars, i s'acobla a diversos complexos multiproteics<sup>161</sup>, finalment després d'un cert temps la Na<sub>v</sub>1.5 és degradada<sup>162</sup>.

Per tant, hi ha moltes proteïnes que intervenen en el fet que la Na<sub>v</sub>1.5 arribi funcional a la superfície cel·lular. Mutacions en alguns dels gens que codifiquen per les proteïnes responsables de les modificacions posttraduccionals i del trànsit de la proteïna, s'han associat com a causants de canalopaties cardíques, i fan evident la seva importància en la regulació i modulació de la Na<sub>v</sub>1.5<sup>112,161,163</sup>.

Aquest apartat no està directament relacionat amb els estudis que es realitzen a la tesi, però sí que es mencionen alguns d'aquests processos a la discussió. S'ha trobat necessària la introducció breu d'aquests processos, ja que són els processos que intervenen en el fet d'aconseguir canals funcionals a la membrana. Per tant, introduint-los es fa palesa la quantitat de mecanismes complexos en els quals hi intervenen diverses proteïnes que si fallen per una mutació, per exemple,

poden ser responsables de les malalties elèctriques cardíques en les quals es centra aquesta tesi. A la figura 16, es poden observar les diferents proteïnes que interaccionen amb la  $Na_v1.5$ , i a la taula 8 la seva funció i possible vinculació de mutacions en els gens que codifiquen per aquestes proteïnes a les canalopaties.

### 6.3.1. Glicosilació

La glicosilació és un dels processos posttraduccional més comuns en les proteïnes secretades o transmembrana amb dominis extracel·lulars. La glicosilació pot afectar l'activitat i l'estabilitat de la proteïna a la membrana. En el RE i el golgi, les subunitats  $Na_v\alpha$  i  $Na_v\beta$  se sotmeten a un procés seqüencial de glicosilació, que pot augmentar la massa d'aquestes subunitats un 15% en les subunitats  $Na_v\alpha$  i un 30% en subunitats  $Na_v\beta$ <sup>121</sup>. La presència de glicosilació tant en les mateixes  $Na_v\alpha$  com en les  $Na_v\beta$ , en especial la sialització, remarca el paper fonamental d'aquesta modificació posttraduccional en la regulació de la proteïna, paper que ha estat explorat i reconegut com un potencial modulador de la dependència de voltatge d'aquests canals per diversos estudis 94,146,148,164.

### 6.3.2. Fosforilació

Diversos estudis revelen un rol de les fosforilases en la modulació del  $I_{Na}$  cardíaca (revisats a Rook *et al.* (2012)<sup>161</sup> i Adsit *et al.* (2013)<sup>163</sup>). Els estudis demostren una possible modulació de la fosforilació de la proteïna kinasa A i C, en la modulació del  $I_{Na}$  directament o indirectament.

D'altra banda, s'ha demostrat la regulació de la  $Na_v1.5$  a través del  $Ca^{+2}$ , per interacció de la calmodulina (CaM), la proteïna kinasa II dependent de  $Ca^{+2}$  (CaMKII), i possiblement una modulació directe dels ions  $Ca^{+2}$ . Finalment, s'ha descrit també una modulació de la inactivació de la  $Na_v1.5$  a través de l'activitat de proteïnes tirosina-quinases Fyn i les tirosina-fosfatases PTPH1, respectivament.

### 6.3.3. Metilació

Recentment, s'ha demostrat per primera vegada la regulació posttraduccional de la  $Na_v1.5$  per la metilació de les arginines 513, 526 i 680 del llaç entre el domini DI i II de la  $Na_v1.5$ <sup>165</sup>. També s'ha demostrat que les proteïnes catalitzadores de la metilació d'arginines 3 i 5 (proteïnes arginina metiltransferases, PRMT3 i 5) són les que regulen aquesta metilació en la  $Na_v1.5$ . La seva coexpressió en un sistema d'expressió heteròloga augmenta significativament el  $I_{Na}$  per un augment de l'expressió de la  $Na_v1.5$  a la superfície cel·lular<sup>91</sup> (Taula 8A, Figura 16).

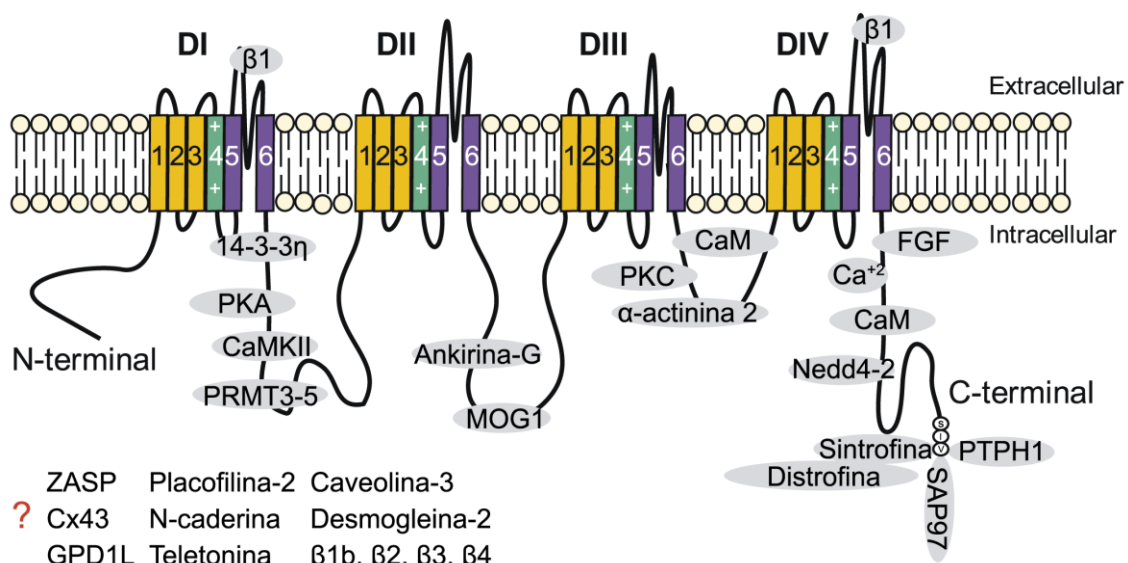
### 6.3.4. Ubiquitinació

La Nedd4-2, de la família E3 ubiquitina-lligases, té un paper fonamental en la degradació de la  $Na_v1.5$ . Els estudis han demostrat que la coexpressió de la Nedd4-2 amb la  $Na_v1.5$  en un sistema d'expressió heteròloga resulta en una disminució del  $I_{Na}$  a causa d'una reducció de  $Na_v1.5$  a la membrana plasmàtica. També, s'ha demostrat que la seva

interacció amb la Na<sub>v</sub>1.5, es produeix a través del motiu PY en el C-terminal<sup>166</sup> (Taula 8A i B, Figura 16).

### 6.3.5. Trànsit

Els estudis de caracterització del complex multiproteic del canal de sodi cardíac en l'estudi del trànsit de la Na<sub>v</sub>1.5 i dels processos moleculars que succeeixen, ha involucrat en aquest trànsit a diverses proteïnes. La taula 8A i B i la figura 16 resumeixen el lloc d'interacció, els efectes en la localització de la Na<sub>v</sub>1.5, i els efectes en les propietats biofísiques del canal, de les proteïnes accessòries involucrades en el trànsit descrites fins al moment<sup>112,161,163</sup>.



**Figura 16. Representació de l'estructura primària de la Na<sub>v</sub>1.5 i els llocs d'interacció de les subunitats β i les altres proteïnes accessòries.** Proteïnes en interrogant; el lloc d'unió, fins al moment, es desconeix.

Proteïna (Gen)	Lloc d'interacció amb Na <sub>v</sub> 1.5	Efectes en la localització i estat de Na <sub>v</sub> 1.5	Efectes en les propietats biofísiques de Na <sub>v</sub> 1.5	Canalopatia
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase ( <i>GPD1L</i> )	nd- interacció via PKC	Rol en el trànsit a la superfície cel·lular	Alteració del I <sub>Na</sub> dels mutants	SBr i MSL
Calmodulin ( <i>CALM</i> )	Motiu IQ (1900–1920aa) en el C-term i llaç entre DIII-IV	Augment de la sensibilitat al Ca <sup>2+</sup>	Efectes discrepants en la modulació de Na <sub>v</sub> 1.5	LQTS
CaMKII ( <i>CAMK2A</i> )	Llaç entre DI-II <i>via</i> βIV-spectrina	Fosforilació de serines i treonines	Modulació de les propietats biofísiques del canal	-
Tirosina fosfatases ( <i>PTPH1</i> o <i>PTPN3</i> )	Motiu SIV al C-terminal	Fosforilació de les tirosines	Modulació de la dependència de voltatge de la inactivació	-
Arginina metiltransferasa 3 i 5 ( <i>PRMT 3 i 5</i> )	Metilació aminoàcids 513, 526 i 680 del llaç entre DI- II	Metilació i augment de l'expressió a la superfície cel·lular	Augment de I <sub>Na</sub>	-
E3 ubiquitina lligasa Nedd4-2 ( <i>NEDD4L</i> )	Motiu PY al C-terminal	Ubiquitinació i reducció de l'expressió a la superfície cel·lular	Reducció del I <sub>Na</sub>	-
α-Sintrofina ( <i>SNTA1</i> )	Motiu PDZ al C-terminal	Interacció <i>via</i> distrofina al citoesquelet	Augment de I <sub>Na</sub> i I <sub>Na,T</sub>	SQTL
Plasma membrane Ca <sup>2+</sup> -ATPasa (PMCA) 4b nNOS	Interaccionen amb la Na <sub>v</sub> 1.5 <i>via</i> α-Sintrofina. S'ha observat que mutacions a la α-Sintrofina trenquen la unió de la Na <sub>v</sub> 1.5 amb la PMCA4b i impedeix la inhibició de la nNOS, augmentant el I <sub>Na</sub> i el I <sub>Na,T</sub> , causant SQTL.			
SAP97	Motiu PDZ al C-terminal	Trànsit i ancoratge als discs intercalars	SAP97 silenciada= reducció del I <sub>Na</sub>	-
Anquirina G ( <i>ANK3</i> )	Motiu VPIAxxSD al llaç intracel·lular DII-III	Retenció a la membrana lateral i discs intercalars dels cardiomiòcits	Anquirina G silenciada = reducció del I <sub>Na</sub>	-
RANGRF (o <i>MOG1</i> )	Llaç intracel·lular entre DII-III	Augment expressió a la superfície cel·lular	Augment del I <sub>Na</sub>	SBr
Teletonina ( <i>TCAP</i> )	nd	nd	Teletonina silenciada= modulació dependència voltatge de l'activació	-
α-actinina 2 ( <i>ACTN2</i> )	Llaç intracel·lular entre DIII-IV	Augment expressió a la superfície cel·lular	Augment del I <sub>Na</sub>	-
Desmogleina 2 ( <i>DSC2</i> )	nd	nd	DSG2 Sobreexpressada en ratolí amb ARVC= reducció del I <sub>Na</sub>	-

**Taula 8A. Resum de les proteïnes que interaccionen i regulen la localització i/o funció de la Na<sub>v</sub>1.5.** nd= no determinat. Taula adaptada de Rook 2012<sup>161</sup>, Shy, 2013<sup>112</sup> i Adsit, 2013<sup>163</sup>.

Proteïna (Gen)	Lloc d'interacció amb Na <sub>v</sub> 1.5	Efectes en la localització i estat de Na <sub>v</sub> 1.5	Efectes en les propietats biofísiques de Na <sub>v</sub> 1.5	Canalopatia
Placofilina 2 (PKP2)	nd	nd	PKP2 silenciada= reducció del I <sub>Na</sub> i alteració de propietats biofísiques del canal. PKP2 mutades no restauren l'efecte de la PKP2 <sup>-/-</sup> , comparat amb la WT	SBr
Factors de creixement de fibroblasts (FHF1B, FGF14 o FGFG13)	Residus 1773–1832 del C-terminus	nd	Modulació de propietats biofísiques i densitat de canals a la membrana	-
14-3-3η (YWHAH)	Llaç intracel·lular entre DI-II	nd	Modulació de la dependència de voltatge de la inactivació	-
Caveolina-3 (CAV3)	nd	Estimulació del receptor β-adrenèrgic, depenent de la presentació de Na <sub>v</sub> 1.5 a les caveoles del sarcolemma	Regulació de l'amplitud de I <sub>Na</sub> depenent de l'estimulació β-adrenèrgica.	-
ZASP (LDB3)	Interacciona amb el motiu PDZ a la α-actinina 2, però la interacció amb Na <sub>v</sub> 1.5 nd	Manteniment de l'estabilitat dels discs Z del múscul cardíac i esquelètic	Modulació de la dependència de voltatge de l'activació	-
Connexina 43 (CX43)	nd	Diversos estudis evidencien una interacció entre Na <sub>v</sub> 1.5, Cx43, N-Cadherina, AnkG, i PKP2, en els discs intercalars dels miòcits, i alteracions d'aquestes proteïnes en cardiomiopaties aritmogèniques.		
N-cadherina (CDH2)	nd			

**Taula 8B. Resum de les proteïnes que interaccionen i regulen la localització i/o funció de la Na<sub>v</sub>1.5** . nd= no determinat. Taula adaptada de Rook 2012<sup>161</sup>, Shy, 2013<sup>112</sup> i Adsit, 2013<sup>163</sup>.



## **7. Mecanismes cel·lulars d'alteració del $I_{Na}$ en la SQTL i la SBr**

En els primers apartats de la introducció de la tesi, s'han donat les bases de l'excitabilitat cardíaca i s'ha explicat la clínica relacionada a la SQTL i a la SBr, i els gens als quals s'hi han associat mutacions a les respectives malalties.

D'altra banda, també s'ha donat una visió més microscòpica de com es produeix el pas dels corrents per la membrana plasmàtica, i centrat en el sodi, com es pot registrar aquest corrent i quina és l'estructura de les proteïnes gràcies a les quals es condueix el sodi.

Tant la SQTL com la SBr tenen en comú que una desregulació del sodi pot provocar ambdues malalties. Un augment de la funció del canal de sodi cardíac pot explicar la prolongació del PAC portant a una SQTL; i una disminució de  $I_{Na}$  pot explicar la SBr per un defecte en la fase 0 del PAC.

En aquest últim apartat de la tesi, es pretén explicar per quins mecanismes electrofisiològics, les mutacions relacionades a una alteració al corrent de sodi poden causar SQTL, i SBr.

### **7.1. SQTL: Augment de la funció del canal de sodi cardíac**

Fins al moment, les mutacions causals de SQTL associades a un guany de funció del corrent sodi, s'han descrit al gen que codifica per la mateixa subunitat  $\alpha$  del canal de sodi cardíac *SCN5A* (SQTL3), al gen que

codifica per la  $\text{Na}_v\beta_4$  (*SCN4B*, SQT10), i als gens que codifiquen per altres proteïnes reguladores com la caveolina 3 (*CAV3*, SQT19) i la  $\alpha$ -sintrofina (*SNTA1*, SQT12).

Actualment s'han associat a SQT al voltant de 200 mutacions al *SCN5A*, de les quals unes 55 han sigut estudiades funcionalment<sup>c</sup>; dues mutacions en el gen *SCN4B*, de les quals només la primera ha sigut estudiada funcionalment<sup>51,158</sup>; cinc mutacions a la *CAV3*, de les quals 4 s'han estudiat funcionalment<sup>167</sup>; i tres mutacions a la *SNTA1*, totes tres estudiades funcionalment<sup>168-170</sup>.

En els quatre tipus de SQT associades a una disfunció del sodi, el principal mecanisme pel qual les mutacions prolonguen el QT està relacionat a un augment la densitat de  $I_{\text{NaT}}$  (Figura 17A). Aquest increment del  $I_{\text{NaT}}$ , pot provocar un augment del flux de  $I_{\text{Na}}$  durant la fase *plateau* i de repolarització del PAC (fases 2 i 3), i allargar la repolarització del PAC i desenvolupar la prolongació del QT observat als ECG<sup>71,73,158,167,168,171</sup>.

Els resultats dels estudis funcionals de mutacions relacionades amb SQT, evidencien que hi ha diverses alteracions en les propietats del canal de sodi cardíac que poden provocar un guany de la seva funció. En tots aquests casos, com a resultat de l'alteració del canal provocat per una mutació, hi ha una major entrada de sodi durant la fase *plateau* del PAC.

---

<sup>c</sup>Font: Dades obtingudes de la Biobase HGMD Professional 2014.1 (<https://portal.biobase-international.com/>)

Els canvis en el corrent es poden deure a: (1) una alteració de la dependència de voltatge, augmentant la finestra de corrent; (2) una desacceleració de la inactivació; (3) un augment en el temps de recuperació de la inactivació; i/o (4) un augment el pic de  $I_{Na}$ <sup>71,171</sup>:

(1) En el rang de voltatge la finestra entre la corba d'activació i inactivació depenent de voltatge, un petit percentatge de canals que no estan inactivats podrien obrir-se. En conseqüència es produeix una entrada de  $Na^+$  en la fase del PAC corresponent a aquest rang de voltatge, que se solen produir durant la fase 3. En condicions normals l'efecte d'aquest  $I_{Na}$  és mínima; però un increment en l'àrea d'aquesta finestra —sigui per una desviació en la corba d'inactivació cap a potencials més positius, per una desviació de la corba d'activació a potencials més negatius, o una desviació d'ambdues dependències de voltatge a la vegada— seria suficient per donar un desequilibri en els corrents que provocarien un allargament de la fase 3 i per tant prolongarien el QT<sup>71,158,170,171</sup> (Figura 17B).

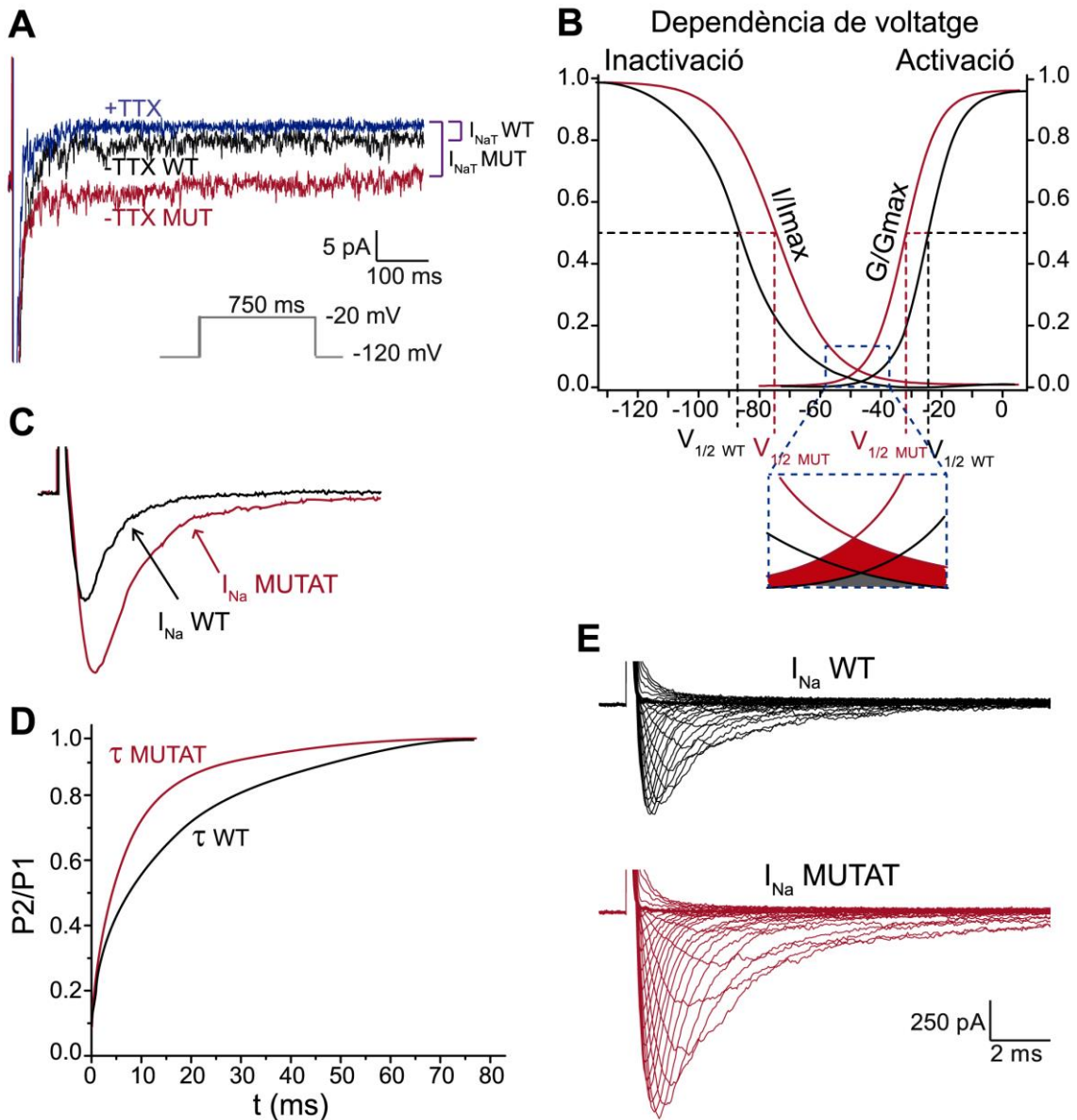
(2) Una desacceleració de la inactivació, provocaria una caiguda més lenta dels corrents macroscòpics. Aquest mecanisme podria provocar un augment del  $I_{NaT}$  i podria afectar la dependència de voltatge d'altres corrents entrants o sortints que alterarien el PAC (Figura 17C)<sup>71,171</sup>.

(3) Una recuperació de la inactivació significativament més ràpida és freqüent en els mutants de SQT3. A causa d'aquesta acceleració de la recuperació de la inactivació es podrien causar reobertures en la

repolarització de la fase 1 del PAC, i augmentarien el flux de  $I_{Na}$  en la fases 2 del PAC (Figura 17D)<sup>71,171</sup>.

(4) Finalment, un augment del corrent en el pic de  $I_{Na}$ , provocaria un guany de funció a la fase 0 del PAC. Es creu que aquest augment podria afectar indirectament i alteraria els altres corrents (Figura 17E)<sup>71,170,171</sup>.

En conjunt, l'augment de la densitat de  $I_{NaT}$ , les reobertures, i el desequilibri dels altres corrents durant la fase *plateau* i de repolarització del PAC, poden ser el desencadenant de l'allargament del QT i de les arítmies letal, com una TdP o una FV, que poden desencadenar a la fi una MSC<sup>71,171</sup>.



**Figura 17. Mecanismes de guany de funció del canal de sodi cardíac. A.** Augment de el corrent de sodi tardà ( $I_{NaT}$ ). **B.** Alteració en la dependència de voltatge, que augmenta el corrent en la finestra entre les dues corbes. **C.** Descens de la constant d'inactivació del canal. **D.** Recuperació de la inactivació més ràpida. **E.** Augment del corrent de sodi en el pic. La línia vermella representa el canal mutat i la negra el WT.

## 7.2. SBr: Disminució de la funció del canal de sodi cardíac

La major part de les mutacions que s'han associat a SBr s'han identificat en el gen *SCN5A* (fins al moment al voltant de 350 mutacions), i prop d'unes 60 mutacions s'han estudiat electrofisiològicament<sup>d</sup>.

A més a més, com s'ha vist en el capítol 4, s'han identificat mutacions causals de SBr en altres gens que codifiquen per proteïnes que formen o regulen el canal de sodi cardíac: *SCN1B* (3 mutacions)<sup>141,144</sup>, *SCN3B* (2 mutacions)<sup>150,151</sup>, *GPD1L* (1 mutació)<sup>172</sup>, *MOG1* (1 mutació)<sup>173</sup>, *SLAMP* (2 mutacions)<sup>174</sup>, i *PKP2* (5 mutacions)<sup>95</sup>.

La pèrdua de funció del canal de sodi cardíac a causa de les mutacions en aquests gens es pot explicar a través diferents mecanismes:

(1) Mutacions radicals al *SCN5A* que resultin en una  $Na_v1.5$  truncada i per tant no funcional<sup>71,73,171</sup>.

(2) Mutacions que provoquen una alteració en les propietats biofísiques de la  $Na_v1.5$ , que en conseqüència causen una reducció de  $I_{Na}$  (Figura 18A). Aquestes alteracions s'observen en algunes de les mutacions de la  $Na_v1.5$ , i també a mutacions de les subunitats  $Na_v\beta1$  i  $Na_v\beta3$  que afecten les propietats biofísiques de la  $Na_v1.5$ <sup>71,73,141,150,171</sup>:

(a) La pèrdua de funció del canal és deguda a una desviació de les corbes de dependència de voltatge (Figura 18B): la corba de inactivació es desvia a potencials més negatius disminuint la

---

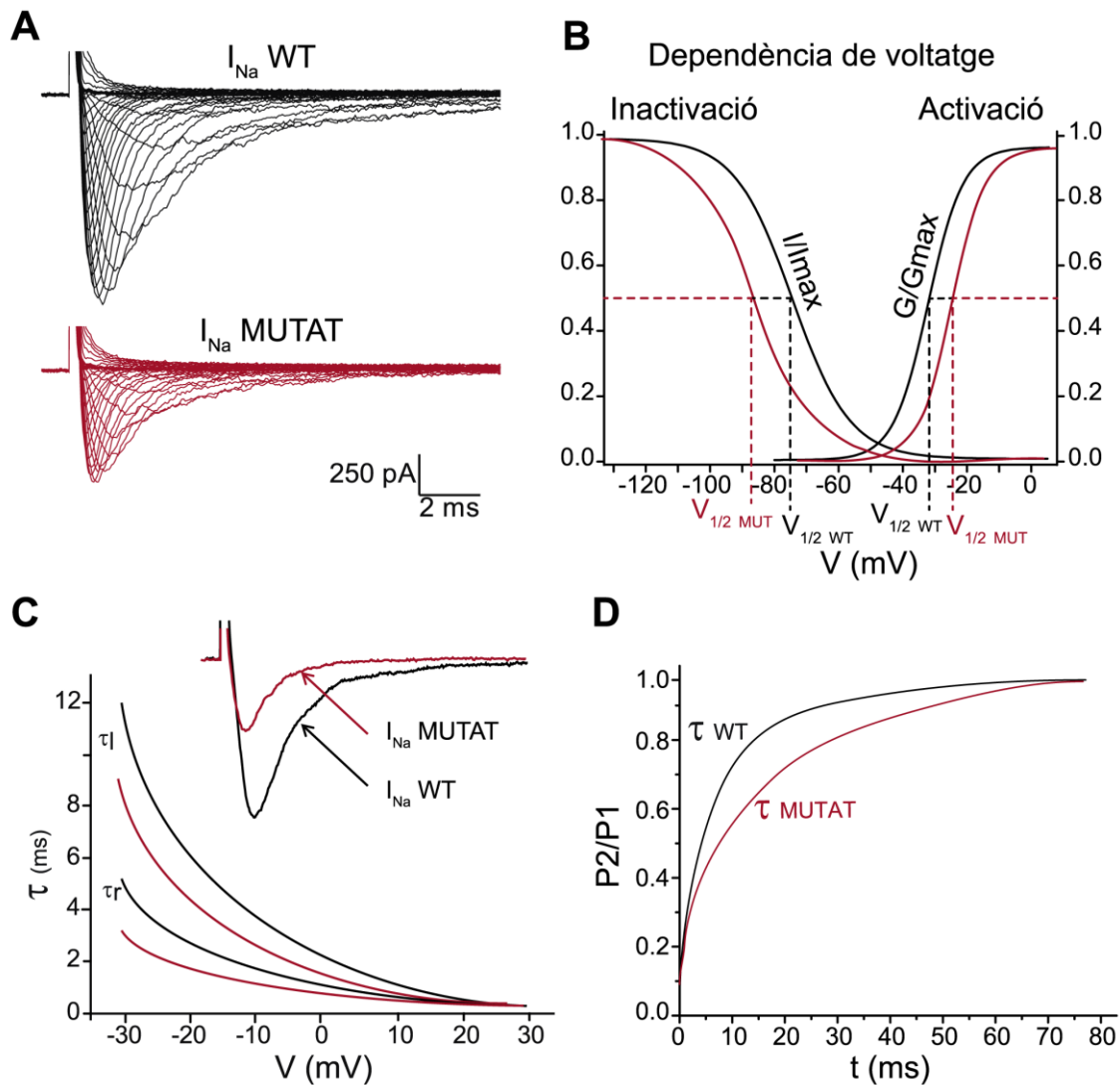
<sup>d</sup> Font: Dades obtingudes de la Biobase HGMD Professional 2014.1

disponibilitat de canals per ser activables; i/o la corba d'activació es desvia a potencials més positius.

(b) Una acceleració de la inactivació que en conseqüència redueix el flux de corrent  $I_{Na}$  a l'inici de la fase *plateau*, i provoca un desequilibri dels corrents en aquesta fase (Figura 18C).

(c) Algunes mutacions provoquen que el canal entri en un estat de inactivació tardana o profunda amb una recuperació de la inactivació més lenta (Figura 18D). Aquest defecte es pot agreujar a freqüències d'estimulació altes, com un augment en el ritme cardíac, ja que la fase 4 s'escurça i provoca un augment en l'acumulació de canals inactivats i per tant una reducció de  $I_{Na}$ . Tot i que una arítmia causada per un estat d'inactivació profunda podria no ser letal en una SBr, ja que les arítmies letals tenen lloc majoritàriament en repòs, la reducció de canals viables en repòs podria provocar també el fenotip de la SBr.

(3) Mutacions que provoquen una reducció significativa del  $I_{Na}$  a causa d'un defecte en el trànsit del canal de sodi cardíac a la superfície cel·lular per la retenció del canal a algun compartiment citoplasmàtic<sup>71,73,171</sup>. Aquest efecte s'ha descrit en algunes mutacions en la mateixa subunitat que formen el canal (la  $Na_v1.5$ , i la  $Na_v\beta3$ )<sup>151</sup>, però és important remarcar que és el mecanisme principal de totes les mutacions descrites a proteïnes reguladores *GPD1L*<sup>172</sup>, *MOG1*<sup>173</sup>, *SLMAP*<sup>174</sup>, i *PKP2*<sup>95</sup>.



**Figura 18. Mecanismes de pèrdua de funció del canal de sodi cardíac. A.** Reducció del  $I_{Na}$ . **B.** Alteració en la dependència de voltatge de la inactivació (a voltatges més negatius) o activació (a voltatge més positius). **C.** Un increment de la constant d'inactivació del canal. **D.** Una recuperació de la inactivació més lenta a causa d'una inactivació més profunda. Els protocols són els mateixos que els explicats en les figures 6 i 7. La línia vermella representa el canal de sodi cardíac mutat i la negra el WT.





**Plantejament de la recerca,  
hipòtesis i objectius**



## Plantejament de la recerca, hipòtesis i objectius

---

A llarg de la introducció, s'han descrit les bases moleculars de l'electricitat i excitabilitat cel·lular i cardíaca, així com les bases clíniques, genètiques i moleculars de la SQTL i la SBr. En la SQTL i la SBr s'ha pogut observar que la diagnosi genètica pot tenir un paper important per donar suport al fenotip, detectar familiars portadors, i en el SQTL per determinar el risc i tractament.

D'altra banda, identificar la mutació causal i els mecanismes moleculars pels quals es dona la malaltia aporta coneixement bàsic sobre el seu funcionament. Tot i això, s'observen limitacions<sup>5,15,46</sup>:

- (1) L'existència de mutacions amb significat incert, i mutacions falses positives catalogades com a causals, però que s'han recatalogat com a mutacions rares no patogèniques després de projectes com el ESP.
- (2) Que després de l'anàlisi genètica romanen sense mutació causal identificada, un 60-75% en pacients amb SBr i un 20-35% en pacients amb SQTL.

(3) L'elevada penetrància incompleta i l'expressivitat variable de les mutacions trobades en pacients amb les corresponents malalties.

Aquesta recerca pretén principalment millorar el nostre coneixement relacionat amb l'aspecte mencionat com a segona limitació, tot i que a més, aporta coneixement que serveix per avançar també en les altres limitacions.

La tesi que es presenta es basa en què un diagnòstic genètic negatiu no exclou el desordre al pacient, ni tampoc que no tingui una mutació o un altre mecanisme que pugui explicar-ne la malaltia, és a dir que poden ser pacients falsos negatius. Les causes de falsos negatius poden ser diverses: mutacions en gens no descrits, variacions en el número de còpies no detectades per Sanger (insercions i delecions grans), o desordres en l'expressió, entre d'altres<sup>46</sup>. Aquesta recerca s'emmarca en el plantejament d'una de les possibles explicacions: els pacients falsos negatius poden ser portadors de mutacions patogèniques a gens encara no associats amb la malaltia.

Davant d'aquesta possibilitat es planteja que els gens que codifiquen per les subunitats  $Na_v\beta$  són gens candidats. Al llarg de la introducció s'ha pogut observar que poden tenir una gran importància en aquestes malalties per dues raons:

(1) Formen part del complex proteic del canal de sodi cardíac, i afecta directament a la funció de la  $Na_v1.5$ . Com s'ha vist a la introducció la

Na<sub>v</sub>1.5 té un paper fonamental en l'excitabilitat cardíaca, i la seva disfunció pot provocar malalties elèctriques com la SQTL i la SBr.

(2) S'han identificat mutacions als gens que codifiquen per la subunitat Na<sub>v</sub>β4 responsables de SQTL, i mutacions als gen que codifiquen per les subunitats Na<sub>v</sub>β1 i Na<sub>v</sub>β3 responsables de la SBr. Per tant, els gens *SCN1B*, *SCN2B* i *SCN3B* en pacients amb SQTL; i els gens *SCN2B* i *SCN4B* en pacients amb SBr; són gens potencialment candidats de poder ser portadors de mutacions que causin aquestes malalties.

### ***Hipòtesis***

Tenint en compte el marc teòric exposat i considerant aquestes limitacions i plantejaments, s'han formulat les següents hipòtesis que emmarquen la present tesi doctoral:

- (1) Esperant que un percentatge de pacients amb SQTL i SBr romandran sense mutació després de l'estudi genètic dels gens prèviament descrits, la nostra hipòtesi és que un percentatge d'aquests pacients negatius tindran mutacions als gens que codifiquen per les subunitats Na<sub>v</sub>β.
- (2) Les subunitats Na<sub>v</sub>β poden ser portadores de mutacions causals de malalties cardíques amb les quals no han sigut prèviament relacionades. Per tant, la nostra hipòtesi és que l'afectació de les mutacions a aquestes subunitats en el canal de sodi cardíac no depèn tant del tipus de subunitat sinó de la mutació en particular.

En acabar la primera etapa de rastreig genètic, han sorgit dues subhipòtesis de les ja plantejades:

- (1) La mutació a la subunitat  $Na_v\beta 1b$  és la responsable del SQTL del cas índex per una afectació del corrent de sodi, i de manera més probable produeix un augment del corrent  $I_{NaT}$ .
- (2) La mutació trobada a la subunitat  $Na_v\beta 2$  és la responsable de la SBr del cas índex per una afectació el corrent de sodi, i de manera més probable produeix una pèrdua de la funció del canal.

## **Objectius**

Per tal d'avaluar les nostres hipòtesis, s'han formulat els següents objectius:

- (1) Diagnosticar genèticament una població clínicament diagnosticada amb SQTL, per:
  - a. Realitzar l'estudi genètic dels gens majoritaris (*SCN5A*, *KCNQ1*, *KCNH2*, *KCNE1*, i *KCNE2*) associats a SQTL, per identificar i avaluar les mutacions patogèniques i caracteritzar les eines predictores de patogenicitat.
  - b. Realitzar l'estudi genètic dels gens que codifiquen les subunitats  $Na_v\beta$  d'una porció de la població anterior, negatius per mutacions patogèniques als gens majoritaris, per identificar el percentatge de pacients amb mutacions a aquests subunitats reguladores del canal de sodi cardíac.

- (2) Realitzar estudis electrofisiològics i bioquímics necessaris per tal d'analitzar el possible efecte patogènic de les mutacions identificades a les subunitats  $Na_v\beta 1b$  i  $Na_v\beta 2$  en les propietats de la  $Na_v1.5$ , i avaluar la possible causalitat d'aquestes mutacions a SQLT i SBr, respectivament.





## **Resultats**



## Resultats

---

En aquesta secció es presenten els tres articles publicats en el transcurs d'aquesta tesi:

**Article 1:** Riuró H, Campuzano O, Berne P, Arbelo E, Iglesias A, Pérez-Serra A, Coll-Vidal M, Partemi S, Mademont-Soler I, Picó F, Allegue C, Oliva A, Gerstenfeld E, Sarquella-Brugada G, Castro-Urda V, Fernández-Lozano I, Mont L, Brugada J, Scornik FS, Brugada R (2014). *Genetic analysis, in silico prediction, and family segregation in Long QT Syndrome*. European Journal of Human Genetics. *In Press*. doi: 10.1038/ejhg.2014.54.

**Article 2:** Riuró H, Campuzano O, Arbelo E, Iglesias A, Batlle M, Pérez-Villa F, Brugada J, Pérez, GJ, Scornik, FS, Brugada R (2014). *A missense mutation in the sodium channel  $\beta 1b$  subunit reveals SCN1B as a new gene responsible for Long QT Syndrome*. Heart Rhythm. 11(7):1202-9. doi: 10.1016/j.hrthm.2014.03.044.

**Article 3:** 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 and Brugada R (2013). *A Missense Mutation in the Sodium Channel  $\beta 2$  Subunit Reveals SCN2B as a New Candidate Gene for Brugada Syndrome*. Human Mutation, 34(7):961-6. doi: 10.1002/humu.22328.



## Article 1

**Títol:** Genetic analysis, *in silico* prediction, and family segregation in Long QT Syndrome.

**Autors:** Helena Riuró, Óscar Campuzano, Paola Berne, Elena Arbelo, Anna Iglesias, Alexandra Pérez-Serra, Mònica Coll-Vidal, Sara Partemi, Irene Mademont-Soler, Ferran Picó, Catarina Allegue, Antonio Oliva, Edward Gerstenfeld, Geòrgia Sarquella-Brugada, Víctor Castro-Urda, Ignacio Fernández-Lozano, Lluís Mont, Josep Brugada, Fabiana S. Scornik, i Ramon Brugada.

**Revista:** European Journal of Human Genetics. Acceptat el 26 de març de 2014. doi: 10.1038/ejhg.2014.54. Estat actual: *in press*.

### Resum

Tal i com s'ha introduït en el marc teòric, la SQTl és una malaltia elèctrica cardíaca, caracteritzada per una prolongació de l'interval QT en el ECG, amb un alt risc de patir arítmies i MSC. L'objectiu d'aquest treball és contribuir amb noves dades en el coneixement de les bases genètiques que regeixen aquesta malaltia, i també avaluar l'anàlisi genètica en les decisions clíniques.

Per assolir aquest objectiu s'ha analitzat per seqüenciació directe pel mètode Sanger els exons que codifiquen pels 5 gens majoritaris associats a SQTl (*KCNQ1*, *KCNH2*, *SCN5A*, *KCNE1* i *KCNE2*), a una població de 115 pacients prèviament diagnosticats amb SQTl. La patogenicitat de les mutacions trobades, s'ha analitzat per segregació

familiar, freqüència al·lèlica en les bases de dades públiques, conservació entre espècies, i predictors *in silico*.

Les mitjanes de QTc, edat, i ràtio entre dones i homes obtingudes han sigut similar als estudis previs. S'ha identificat mutació en el 51,3% dels casos índex, majoritàriament en *KCNQ1*, *KCNH2* i *SCN5A*. S'han identificat un total de 36 mutacions prèviament descrites, i 18 mutacions noves. Després dels estudis de patogenicitat de les mutacions identificades, 39 mutacions s'han considerat potencialment patogèniques, 12 de significat incert i 3 probablement no patogèniques. S'han identificat múltiples mutacions en un 5,2% dels casos. Finalment, s'ha observat que el percentatge de pacients amb mutació identificada augmenta fins un 63,6% quan s'analitzen els pacients amb una puntuació de Schwartz  $\geq 3,5$ , i que puja fins a un 75,7% quan s'han analitzat únicament els pacients amb un QTc  $\geq 500$ ms. També s'ha observat que el número de VUS disminueix en aquests pacients més severos, i augmenta el número de mutacions patogèniques i múltiples mutacions.

De l'article en deriven diverses conclusions: la probabilitat d'identificar la mutació probablement causal augmenta en funció de la severitat de la malaltia, tot i això roman un percentatge de pacients sense mutació identificada; el número de VUS trobades és elevat la qual cosa complica les conclusions diagnòstiques; i finalment, de moment la segregació familiar és clau per determinar la patogenicitat de les mutacions.

## Article 2

**Títol:** A missense mutation in the sodium channel  $\beta 1b$  subunit reveals *SCN1B* as a susceptibility gene underlying Long QT Syndrome.

**Autors:** Helena Riuró, Òscar Campuzano, Elena Arbelo, Anna Iglesias, Montserrat Batlle, Félix Pérez-Villa, Josep Brugada, Guillermo J. Pérez, Fabiana S. Scornik, i Ramon Brugada.

**Revista:** Heart Rhythm 11(7):1202-9, Juliol 2014. doi: 10.1016/j.hrthm.2014.03.044.

### Resum

En aquest projecte se seqüencien els gens que codifiquen per les subunitats  $Na_v\beta$  de 30 pacients amb SQTL de l'article 1, sense mutació patogènica identificada en els gens majoritaris. L'objectiu d'aquesta anàlisi és identificar si algun d'aquests pacients són portadors d'alguna mutació en les subunitats  $Na_v\beta$  que pugui explicar la malaltia. En SQTL l'única subunitat  $Na_v\beta$  que s'ha relacionat prèviament amb la malaltia és la  $Na_v\beta 4$ . En aquesta anàlisi genètica s'ha identificat la mutació *SCN1B* p.(Pro213Thr) en un pacient de 8 anys que va ser diagnosticat després de patir un síncope quan el van fer sortir a la pissarra a l'escola. L'estudi clínic i genètic dels familiars confirmen segregació familiar amb penetrància incompleta.

Els objectius experimentals que prossegueixen a aquesta anàlisi són estudiar electrofisiològicament els efectes reguladors de la subunitat  $Na_v\beta 1b$ WT a la funció de la  $Na_v 1.5$ , i estudiar electrofisiològicament en un



sistema d'expressió heteròloga la mutació *SCN1Bb* p.(Pro213Thr) per tal de determinar si la mutació és probablement la causant de la malaltia.

Els resultats obtinguts de l'efecte de la subunitat  $\beta 1bWT$  en la funció de la  $Na_v1.5$ , han mostrat que la  $\beta 1bWT$  augmenta significativament la densitat del  $I_{Na}$ , i disminueix el número de canals en inactivació tardana.

Els resultats de l'estudi de l'alteració causada per la  $\beta 1bP213T$  en la  $Na_v1.5$  comparada amb la  $\beta 1bWT$ , han revelat que la mutació altera diverses propietats del corrent.

La  $\beta 1bP213T$  causa tres efectes significatius però subtils que poden contribuir en el guany de funció de la  $Na_v1.5$ : la  $\beta 1bP213T$  desvia la finestra de corrent de la dependència de voltatge, accelera la recuperació de la inactivació, i disminueix l'entrada del canal en un estat d'inactivació profunda. D'altra banda, la mutació augmenta significativament el  $I_{NaT}$ , sent aquest l'efecte principal de les mutacions associades a SQT3.

Finalment, s'ha estudiat si aquestes alteracions al corrent  $I_{Na}$  pot provocar un allargament del potencial d'acció en cèl·lules HL-1. Amb aquests experiments s'ha confirmat que la mutació augmenta significativament la duració del potencial d'acció, en comparació amb el PA de les HL-1 que expressen  $\beta 1bWT$ .

Aquests resultats demostren que la mutació  $\beta 1bP213T$  altera la funció de  $Na_v1.5$  allargant el PA, i per tant que la mutació *SCN1Bb* p.(Pro213Thr) és potencialment la causant de la SQT3 en la família estudiada.

### **Article 3**

**Títol:** A missense mutation in the sodium channel  $\beta 2$  subunit reveals *SCN2B* as a new candidate gene for Brugada Syndrome.

**Autors:** Helena Riuró, Pedro Beltran-Alvarez, Anna Tarradas, Elisabet Selga, Óscar Campuzano, Marcel Vergés, Sara Pagans, Anna Iglesias, Josep Brugada, Pedro Brugada, Francisco M. Vázquez, Guillermo J. Pérez, Fabiana S. Scornik, i Ramon Brugada.

**Revista:** Human Mutation 34(7):961-6, Juliol 2013. doi: 10.1002/humu.22328.

### **Resum**

Aquest projecte es basa en els resultats obtinguts en un projecte no presentat en aquesta tesi, en el que es seqüencien els gens que codifiquen per les subunitats  $Na_v\beta$  en 38 pacients amb SBr sense mutacions identificades als gens prèviament relacionats amb la malaltia. En aquest projecte es va identificar la mutació *SCN2B* p.(Asp211Gly) en una pacient de 47 anys diagnosticada amb SBr després d'ingressar a l'hospital per síncope.

La hipòtesi plantejada per aquest tercer estudi és que aquesta mutació pot ser la causal del fenotip patogènic de la família.

En l'estudi clínic i genètic dels familiars s'ha determinat que cap altre familiar amb mutació ha desenvolupat un SBr1 al ECG de manera espontània, però aquests tenen principis de SPCC. El test d'ajmalina per millorar la determinació de la segregació familiar, no va ser possible.

Per estudiar els efectes funcionals a la de la mutació a  $\text{Na}_v\beta 2$  ( $\beta 2\text{D}211\text{G}$ ) a la  $\text{Na}_v1.5$ , s'han realitzat estudis electrofisiològics i bioquímics en cèl·lules CHO, transfectades amb  $\text{Na}_v1.5+\beta 2\text{WT}$  i  $\text{Na}_v1.5+\beta 2\text{D}211\text{G}$ .

Els resultats electrofisiològics de la  $\text{Na}_v\beta 2$  mutada, han revelat que la  $\beta 2\text{D}211\text{G}$  disminueix significativament la densitat de  $I_{\text{Na}}$  sense alterar les altres propietats biofísiques del canal.

Hi ha dos possibles mecanismes que poden explicar una reducció del  $I_{\text{Na}}$ : una disminució en la conductància del canal únic, o una disminució del número de canals a la superfície cel·lular. Els resultats obtinguts en estudiar el primer mecanisme, han revelat que no es troba afectada aquesta propietat del canal. Per contra, els assajos de purificació de les proteïnes de membrana, han demostrat una disminució de la quantitat de  $\text{Na}_v1.5$  a la superfície cel·lular quan aquesta es troba coexpressada amb la  $\beta 2\text{D}211\text{G}$ , en comparació amb la  $\beta 2\text{WT}$ . Finalment, experiments d'immunoprecipitació han determinat que no es troba alterada la interacció entre la  $\text{Na}_v1.5$  i la  $\beta 2$  per un efecte de la mutació.

Per tant, aquests resultats suggereixen que la mutació  $\beta 2\text{D}211\text{G}$  pot provocar una disminució del  $I_{\text{Na}}$  a causa d'una reducció de l'expressió de  $\text{Na}_v1.5$  a la superfície cel·lular, la qual cosa explica la SBr i els principis de SPCC a la família.

**Discussió**



## Discussió

---

Les primeres mutacions genètiques associades a la SQT, es van descobrir el 1995-1996<sup>30-32</sup>. Actualment s'han associat mutacions a 16 gens amb la malaltia<sup>18,46</sup>. El 1992 es descobria la SBr<sup>53</sup>, i el 1998 s'identificava per primera vegada una mutació en el gen *SCN5A* com a causal de la SBr<sup>66</sup>. El 2014 ja hi ha identificats 18 gens més relacionats amb aquesta malaltia<sup>68</sup>.

En els últims 20 anys, s'ha fet un gran avenç a la pràctica clínica i genètica relacionada amb aquestes malalties elèctriques hereditàries, la qual cosa ha portat a conèixer més profundament les seves bases genètiques i de la MSC. Tot i això, encara romanen preguntes, i vora un 60-75% dels pacients amb SBr i un 20-35% dels pacients amb SQT sense diagnòstic genètic.

Els resultats obtinguts en els tres articles que emmarquen la present tesi es poden dividir en quatre blocs de discussió:

(1) En els dos primers articles s'ha realitzat una anàlisi genètica dels gens majoritaris associats a SQT en 115 pacients (Article 1), i dels gens que codifiquen per les subunitats  $Na_v\beta$  d'una població de pacients amb

SQTL sense mutació als gens majoritaris (Article 2). En aquest primer apartat es discutiran els resultats obtinguts del primer article, i també la freqüència de diagnòstic dels gens minoritaris i els gens candidats, tant en SQTL com en SBr, corresponents al primer objectiu de la tesi.

(2) En el segon i tercer article s'ha demostrat la possible causalitat de les mutacions trobades en els gens *SCN1Bb* i *SCN2B*, associant-les per primera vegada a la SQTL i SBr, respectivament. En aquest apartat es discutiran els resultats obtinguts corresponents al segon objectiu de la tesi.

(3) D'altra banda, el segon i el tercer article també contribueixen en la recerca del paper de les subunitats  $Na_v\beta$  en relació a la  $Na_v1.5$ , i en definitiva, contribueixen en aportar més indicis de la seva importància en la modulació i regulació de la funció del canal de sodi cardíac.

(4) Finalment, l'últim apartat de la discussió se centrarà en avaluar les diferents limitacions, perspectives i reptes, de l'anàlisi genètica de les canalopaties cardíques, del paper de les  $Na_v\beta$  en la funció cardíaca i dels estudis *in vitro* per avaluar la causalitat de les mutacions trobades.

## **1. El paper de l'estudi genètic en la SQTL i la SBr, i del descobriment de nous gens candidats.**

### **1.1. Anàlisi genètica, predicció *in silico*, i segregació familiar en el diagnòstic genètic dels pacients amb SQTL**

En la nostra cohort de 115 pacients de SQTL no relacionats, la mitjana d'edat, la ràtio entre dones i homes i la mitjana del QTc és similar a la dels estudis previs<sup>37-39,41,175</sup>. Per tant, la nostra població és representativa dins del global de pacients amb SQTL.

Els estudis previs descriuen que la identificació de mutacions és d'un 70-75% dels casos<sup>36-38</sup>. Tot i això, també hi ha estudis més recents que observen que la taxa d'identificació en l'anàlisi genètica dels pacients de SQTL és al voltant del 50%<sup>39,41</sup>, però aquest percentatge augmenta fins al 75% quan aquests pacients tenen un valor de la taula de Schwartz  $\geq 4$  punts<sup>38</sup>.

En el nostre estudi s'ha identificat que el 51,3% dels pacients són portadors d'una o més mutacions en alguns dels 5 gens seqüenciats, però igual que a l'estudi de Tester *et al.* (2005)<sup>38</sup>, quan s'han analitzat els pacients amb una puntuació de Schwartz  $\geq 3,5$  punts, el percentatge de pacients amb mutació identificada és de 63,6%, augmentant fins al 75,7% quan s'han analitzat només els pacients amb un QTc  $\geq 500$  ms. A més, s'ha observat que la probabilitat de trobar mutacions potencialment patogèniques en aquest pacients augmenta en comparació amb els pacients amb un QTc  $< 500$  ms. Un fet similar succeeix quan s'han



analitzat els pacients segons edat. Si s'analitzen només aquells pacients en què l'edat de diagnosi és menor a 40 anys, el percentatge de pacients amb una mutació identificada augmenta fins al 62,3%, similar a l'observat en altres estudis<sup>37,38,41</sup>. Per tant, igual que en altres estudis, els nostres resultats suggereixen que l'eficiència de l'anàlisi genètica augmenta com més severa és la malaltia<sup>38,39</sup>, fet que dóna suport a les recomanacions de les guies i directrius a on es recomana diagnosticar genèticament aquells pacients amb una clínica robusta, ja que permet una associació més sòlida del fenotip-genotip<sup>5,14</sup>.

Diversos estudis mostren que el percentatge de pacients amb múltiples mutacions oscil·la entre el 2-11%. De manera similar, en el nostre estudi se n'han identificat un 5,2%. Tot i que els casos índex de les famílies A, C i D (Figura 2, Article1) tenen una clínica més severa dins de la seva pròpia família, no s'observen diferències significatives quan s'ha comparat la població de pacients amb múltiples mutacions amb la dels pacients amb una sola mutació. Per contra, els estudis recents demostren que els pacients amb més d'una mutació tenen el QT significativament més prolongat i una freqüència més elevada d'esdeveniments arítmics que poden ser letals<sup>50,51,176</sup>.

En comparació amb el nostre estudi, aquests estudis s'han realitzat en poblacions més grans ( $\geq 20$  pacients amb múltiples mutacions, i  $> 150$  pacients amb una mutació), per tant, un augment de les nostres cohorts d'estudi podrien afavorir l'observació també de diferències significatives.

## Predicció de la patogenicitat

A la introducció s'han descrit els diferents criteris que es poden utilitzar per tal de predir la patogenicitat de les mutacions trobades: (1) cosegregació familiar; (2) mutació rara o absent a les bases de dades públiques; (3) assaig funcional *in vitro*; (4) mutacions radicals; i (5) prediccions amb programes *in silico*. La falta d'informació familiar, i la falta d'infraestructura per poder realitzar els assajos *in vitro* de múltiples mutacions en poc temps, limita poder predir la patogenicitat de les mutacions utilitzant aquestes dues eines.

Al llarg d'aquests últims anys, s'han dissenyat diversos programes de predicció *in silico* per tal de definir la patogenicitat de les variants: SIFT, Polyhen2, Mutation assessor, Provean, SNP&Go, entre d'altres; i eines de predicció combinada, com Condell o CoVEC (que extreuen el resultat després de consultar les bases de dades individuals anteriors). En el nostre estudi, s'ha utilitzat una eina de predicció combinada, el Condell (que inclou la predicció de SIFT, Polyhen2, Mutation assessor); i una de simple, el Provean, que és l'única que inclou la predicció de delecions i insercions *inframe* (sense corriments del marc de lectura). Estudis previs d'aquestes dues eines determinen que la ràtio de prediccions verdaderes és al voltant del 80%<sup>177,178</sup>. Dels resultats de les prediccions de les 36 mutacions prèviament descrites i les 18 noves que s'han identificat en el nostre estudi, se'n pot extreure la següent informació:

## (1) Mutacions prèviament descrites

Basant-nos en la literatura, la freqüència a la població general, la segregació familiar i la conservació entre espècies s'ha considerat que 30 de les mutacions són probablement patogèniques: 5 mutacions radicals (mutacions stop, delecions o insercions *inframe*, o *frameshift*) i 25 *missense*. Les 25 *missense* considerades patogèniques, el Condel n'ha predit com a probablement patogèniques 23 (92%) i el Provean les ha considerat totes potencialment patogèniques (100%). Per tant, la precisió és similar a l'observada en altres estudis, i fins i tot més alta<sup>177,178</sup>.

Quatre de les mutacions identificades s'han considerat VUS ja que dues mutacions estan prèviament associades a altres canalopaties cardíques, SBr [*SCN5A* p.(Arg620Cys)]<sup>67</sup> i SPCC [*SCN5A* p.(Pro1008Ser)]<sup>179</sup>; i les dues restants, *KCNQ1* p.(Pro73Thr) i *SCN5A* p.(Ser216Leu), són considerades VUS a la literatura ja que s'han trobat en població general<sup>45,180</sup>.

Finalment, les mutacions [*KCNE1* p.(Asp85Asn) i *KCNE2* p.(Thr8Ala)] s'han considerat no causals de la malaltia. Tot i que la freqüència a població general és  $\leq 1$ , els resultats obtinguts en estudis previs<sup>45,181-183</sup> i la segregació familiar, apunten que aquestes dues mutacions siguin considerades no patogèniques. D'altra banda, el Condel ha predit *KCNE1* p.(Asp85Asn) i *KCNE2* p.(Thr8Ala) com a neutrals, però en canvi el Provean les ha predit com a patogèniques. Aquests resultats podrien

estan d'acord amb el 20% de falsos positius que poden persistir després de les prediccions<sup>177</sup>.

## (2) Mutacions noves

Les 18 mutacions noves que s'han identificat en el primer article, per tant absents a les bases de dades de mutacions, 7 són radicals i 11 *missense*. A la literatura, hi ha diversos articles que publiquen esquemes de la probabilitat de la patogenicitat de mutacions noves en funció del tipus de mutació, localització en la proteïna, i predicció *in silico*<sup>17,18,184</sup>.

Breument, en aquests estudis es determina que les mutacions *missense* trobades en el N-terminal del K<sub>v</sub>7.1, K<sub>v</sub>11.1 i Na<sub>v</sub>1.5 (exceptuant les zones conservades amb funcionalitat en aquest domini), es podrien catalogar com a VUS (≤75% de possibilitats de ser patogèniques) i confirmar la seva patogenicitat a través de programes *in silico*, segregació i/o assajos *in vitro*. Algunes regions del C-terminal del K<sub>v</sub>11.1 i Na<sub>v</sub>1.5 tenen entre un 50-80% de ser patogèniques. I en canvi, les mutacions radicals, o mutacions *missense* en regions essencials de la proteïna (transmembrana o porus) i al C-terminal del K<sub>v</sub>7.1, tenen una probabilitat alta de ser la mutació causal de malaltia (≥80%).

De les *missense* noves, només dues es localitzen en regions amb elevada probabilitat de ser patogèniques: a la regió del porus [KCNQ1 p.(Tyr315His)] i al llaç extracel·lular DIII S5-S6 de la Na<sub>v</sub>1.5 [SCN5A p.(Gly1329Ser)]. D'acord amb la seva potencial patogenicitat, els dos programes *in silico* consultats les han predit com a patogèniques.

Les 9 *missense* restants es localitzen totes en regions amb menys probabilitat de ser patogèniques, però en canvi, tots els aminoàcids corresponents a les noves mutacions estan conservats entre espècies menys la mutació *KCNH2* p.(Gly238Arg). L'anàlisi de patogenicitat via predictors *in silico*, les prediu com a neutrals o difereixen en la seva predicció. Per tant, la predicció *in silico* d'aquestes 9 mutacions és ambigua i es necessita l'estudi de segregació familiar o els assajos funcionals per poder avaluar-ne la causalitat. D'aquestes 9 mutacions corresponents a 9 casos índex diferents, la història clínica i genètica familiar respectiva només se n'ha disposat de 3: les mutacions *KCNH2* p.(Gly880Val) i p.(Arg356His) s'han identificat conjuntament amb altres variacions en els casos índex, fet que fa més complicada l'anàlisi de la segregació amb el fenotip i per tant la seva predicció de patogenicitat; i la tercera, *KCNH2* p.(Gly238Arg), la seva condició de benigna s'ha reafirmat amb la falta de segregació familiar.

Per tant, després de l'anàlisi de les 18 mutacions noves, 7 es mantenen com a potencialment patogèniques, 8 es mantenen com a VUS a l'espera de més informació familiar o assajos *in vitro*, i una es pot predir com a potencialment benigna.

Finalment, alguns estudis observen un alt percentatge de desacords entre els programes *in silico* utilitzats<sup>180</sup>. En la nostra anàlisi, el Condel i el Provean han estat en desacord en 6 de les 54 mutacions trobades. De la mateixa pàgina del programa Provean, se'n pot extreure que els

predictors SIFT, Polyphen2 i Provean estan d'acord en la predicció d'una variant com a patogènica en un 78,5% de les 15.966 mutacions testades. Per tant, difereixen en un 21,5%<sup>e</sup>. Tot i que un 11% de desacords és dins del rang, es fan indispensables la segregació familiar i/o els estudis funcionals per poder esbrinar la patogenicitat o la neutralitat d'aquestes mutacions, ja que si no, aquestes mutacions es mantenen com a incertes es fa més difícil el diagnòstic genètic dins el diagnòstic clínic<sup>15,18</sup>.

Aquest fet determina que els predictors *in silico* són útils per decidir la patogenicitat, però que encara s'han d'utilitzar juntament amb altres eines com la segregació familiar i estudis *in vitro* per poder acumular evidències de la patogenicitat d'aquestes mutacions, sobretot quan les mutacions es troben en zones en principi funcionalment poc rellevants.

El fet que sense segregació familiar no es pot determinar la causalitat, genera limitacions importants en la diagnosi genètica, ja que les anàlisis genètiques es realitzen majoritàriament només en casos índex. Aquesta situació és problemàtica per poder determinar la verdadera associació patogènica entre la mutació i el fenotip, especialment perquè aquestes mutacions comporten implicacions clíniques importants<sup>15,17,180</sup>.

Ara bé, a la introducció s'ha descrit que el 2012 es va obtenir per primera vegada l'estructura cristal·litzada del canal de sodi de bacteri Na<sub>v</sub>Ab<sup>115</sup>. Estudis que han pogut modelar mutacions a partir de l'estructura tridimensional de la proteïna, poden predir els canvis conformacionals

---

<sup>e</sup> Dades extretes de <http://provean.jcvi.org/about.php>.

que se n'obtidran, i lligat en aquests canvis la possible patogenicitat de la mutació<sup>124,129</sup>.

Tot i que algunes eines predictorres com el Polyphen-2<sup>185</sup>, ja incorporen dins dels algoritmes els canvis en l'estructura, aquesta eina és limitada en els casos que l'estructura proteica no està ben determinada.

En els propers anys, l'avenç que s'està realitzant en la cristal·lització de les proteïnes que codifiquen pels canals de sodi, potassi, i calci, permetrà una predicció més acurada de la patogenicitat de la mutació a través del canvi conformacional concret que provoca a l'estructura proteica<sup>186</sup>.

## **1.2. L'anàlisi genètica de gens minoritaris i gens candidats**

Al llarg de la tesi s'han realitzat estudis genètics dels gens *KCNQ1*, *KCNH2*, *SCN5A*, *KCNE1* i *KCNE2* en una població de pacients de SQTL (Article 1), però també dels gens que codifiquen les  $\text{Na}_v\beta$  en pacients de SQTL (Article 2) i de SBr (article previ relacionat a l'article 3).

En aquest apartat, es discuteix i s'avalua el diagnòstic genètic dels gens minoritaris.

En el segon article, d'una població de 30 pacients SQTL negatius per mutacions a *SCN5A*, *KCNQ1*, *KCNH2*, *KCNE1* i *KCNE2*, s'ha identificat genèticament una mutació al gen *SCN1Bb* p.(Pro213Thr). El tercer estudi prové de la identificació de la mutació *SCN2B* p.(Asp211Gly), en una població de 38 pacients de SBr sense mutacions al gen *SCN5A* (Selga *et al.*, en preparació).

En ambdós estudis, s'han rastrejat els 4 gens que codifiquen per les  $\text{Na}_v\beta$  humanes, per tant es pot analitzar:

(a) La freqüència de mutacions a les subunitats  $\text{Na}_v\beta$  prèviament ja associades a la SBr (*SCN1B* i *SCN3B*) i SCTL (*SCN4B*);

(b) La freqüència de mutacions a les subunitats  $\text{Na}_v\beta$  no associades prèviament a les respectives malalties per identificar nous gens susceptibles a provocar-les.

El resultat obtingut en ambdós estudis són: (a) no s'ha identificat cap mutació en els gens que codifiquen per les subunitats  $\text{Na}_v\beta$  prèviament associades a aquestes malalties, i (b) en una ràtio de 1:38 (2,6%) s'ha identificat una mutació a la  $\text{Na}_v\beta 2$  en una pacient de SBr, i en una ràtio de 1:30 (3,33%) una mutació a la  $\text{Na}_v\beta 1b$  en un pacient de SCTL.

Per tant, aquests resultats suggereixen que la freqüència d'identificació de mutacions potencialment patogèniques en aquests gens és baixa.

Un fet similar es pot observar en el primer article a on s'han seqüenciat els gens *KCNQ1*, *KCNH2*, *SCN5A*, *KCNE1* i *KCNE2* en una població de pacients de SCTL. Només s'ha trobat una possible mutació causal nova en el *KCNE1* (1:115, 0,8%), després de seqüenciar els gens *KCNE1* i *KCNE2* dels 115 pacients. Aquests dos gens codifiquen per les subunitats  $\beta$  del  $\text{K}_v 7.1$  i  $\text{K}_v 11.1$ , respectivament<sup>36,38,41</sup>, per tant, la freqüència alhora de trobar mutacions patogèniques a aquestes subunitats també és baixa.



En conjunt, en els nostres estudis, igual que en estudis previs<sup>36,38,41,141,151,158,187</sup>, s'observa que la probabilitat de trobar mutacions en els gens que codifiquen per les subunitats  $\beta$ , tant de sodi com de potassi, és baixa (entre el 0 i el 3%). D'acord amb les guies i directrius publicades, la baixa probabilitat de trobar mutacions als gens minoritaris associats a les malalties o gens candidats, fa que sigui més indicat que només se seqüenciïn dels gens *SCN5A*, *KCNQ1* i *KCNH2* en SQTL i *SCN5A* en SBr per diagnòstic genètic dins la pràctica clínica<sup>2,5,14</sup>.

Però en recerca, el rastreig de nous gens minoritaris i candidats, permet identificar la freqüència en la qual es troben mutacions probablement patogèniques en aquests gens i nous gens susceptibles de ser portadors de mutacions que provoquin un fenotip de SBr i SQTL, i augmentar el percentatge de pacients amb diagnòstic genètic<sup>18,46,68</sup>.

Per tant, així com el diagnòstic genètic per seqüenciació rutinària per Sanger de les subunitats  $Na_v\beta$  i les  $K_v\beta$ , en pacients de SQTL i SBr, pot ser massa costós si es compara amb el percentatge de resultats obtinguts; si s'utilitzen tecnologies de nova generació, la introducció dels gens que codifiquen per aquestes subunitats en els panells de seqüenciació, ens pot permetre conèixer, a part del diagnòstic, la freqüència en la qual es troben mutacions en aquest gens en pacients de SQTL i SBr.

## **2. Mutacions a les $Na_v\beta$ relacionades a la SBr i la SQTL**

En aquesta tesi s'ha avaluat electrofisiològicament i bioquímicament una mutació a la subunitat  $Na_v\beta 1b$  ( $\beta 1bP213T$ ) identificada a un pacient amb SQTL, i una mutació a la subunitat  $Na_v\beta 2$  ( $\beta 2D211G$ ) trobada en una pacient amb SBr. L'objectiu d'ambdós estudis ha sigut demostrar la patogenicitat de les mutacions trobades, per poder relacionar per primer cop els gens *SCN1Bb* i *SCN2B* com a possibles nous gens responsables de la SQTL i la SBr, respectivament; i demostrar que encara que algunes subunitats  $Na_v\beta$  s'han associat a unes canalopaties cardíques i a altres no, totes són potencialment candidates de ser portadores de mutacions patogèniques que puguin provocar SQTL, SBr, SQTC, SPCC o FAF.

### **2.1. La subunitat $\beta 1bP213T$ altera la funció de la $Na_v1.5$ , i revela el gen *SCN1B* com a nou gen candidat per la SQTL**

En el segon article de la tesi, s'ha identificat una nova mutació *missense* a un nen de 8 anys amb SQTL amb episodis sincopals sota estrès. Fins a dia d'avui, cap mutació s'ha descrit en la  $\beta 1b$  lligada a SQTL.

Mutacions patogèniques en la subunitat  $\beta 1b$  s'han associat a SBr, SPCC i MSL<sup>141,144</sup>. D'altra banda, mutacions patogèniques a la subunitat  $\beta 4$  del canal de sodi s'han associat a SQTL<sup>158</sup>.

La hipòtesi de treball s'ha basat en què la mutació  $\beta 1bP213T$  pot provocar la SQTL al nostre pacient amb un mecanisme similar als

postulats per pacients amb SQT3 i SQT10 amb mutacions a *SCN5A* i *SCN4B*, respectivament.

Tal i com s'ha explicat en la introducció, les mutacions patogèniques lligades a una alteració al canal de sodi cardíac relacionades a SQT majoritàriament incrementen el  $I_{NaT}$ , poden augmentar la finestra de corrent entre la corba de dependència de voltatge de l'activació i la inactivació, poden desaccelerar la constant d'inactivació, accelerar la recuperació de la inactivació, i/o augmentar el  $I_{Na}$  al pic<sup>24,71,158,171</sup>.

Els nostres resultats han revelat que la  $\beta$ 1bP213T produeix un augment del  $I_{NaT}$  i altres múltiples alteracions subtils a les propietats de la  $Na_v1.5$  que poden explicar el SQT a la família estudiada. Un increment encara que petit en el  $I_{NaT}$  afecta les fases 2 i 3 del PAC, a on normalment només hi ha una petita quantitat de corrent de sodi. Aquest increment pot resultar en una ona T retardada en el ECG, corresponent a la prolongació del QT del nostre pacient, així com una predisposició a arítmies provocades per EADs<sup>171</sup>.

S'ha observat que la  $\beta$ 1bP213T desvia significativament l'activació dependent de voltatge cap a potencials més negatius, que no provoca un augment de la finestra de corrent entre les corbes de dependència de voltatge de l'activació i inactivació, però sí un desplaçament a potencials més negatius. Com que aquests potencials es produeixen al final del PAC, un augment del corrent de sodi en aquesta etapa seria una de les

causes que contribuïrien a una repolarització més lenta i prolongarien el QTc en el nostre pacient<sup>171</sup>.

D'altra banda, els nostres resultats han revelat que la probabilitat de tenir canals a l'estat d'inactivació profunda és significativament menor quan la Na<sub>v</sub>1.5 es troba en presència de la β1bP213T comparada amb la β1bWT. Una disminució dels canals en estat d'inactivació profunda, equivaldria a tenir més canals viables per activar-se en comparació amb el WT i acceleraria també la recuperació de la inactivació, en la qual també s'observen diferències. Aquestes alteracions, podrien provocar reobertures del canal de sodi durant la repolarització del PAC i podrien provocar la prolongació del QTc i també podria ser un substrat per la inducció d'arítmies<sup>102,188</sup>.

Finalment, el possible rol patogènic de la β1bP213T es confirma amb l'augment significatiu de la duració del PA en les cèl·lules HL-1 que sobreexpressen β1bP213T en comparació amb les β1bWT.

És interessant remarcar, que tot i que la major part de SQT3 presenten els síncope o les arítmies letals en una situació de repòs o dormint, en el nostre cas d'estudi és sota estrès emocional, que representa un 15% dels casos de SQT3<sup>27,46</sup>. En un futur, seria interessant estudiar com les alteracions subtils observades —l'acceleració de la recuperació de la inactivació, la disminució de la inactivació profunda, i la desviació de la finestra de voltatge— poden estar involucrades en el desencadenament d'arítmies durant exercici i emoció. Es podrien realitzar les anàlisis en

presència o absència de fàrmacs agonistes dels receptors  $\beta$ -adrenèrgics (com l'isoproterenol), imitant *in vitro* una condició d'estrès<sup>189</sup>. Aquests estudis podrien aportar evidències de quines de les alteracions trobades podrien estar involucrades en el desencadenament d'arítmies sota estrès.

## **2.2. La $\beta$ 2D211G altera la funció de la $\text{Na}_v1.5$ , i revela el gen *SCN2B* com a nou gen candidat responsable de la SBr**

El tercer article presentat en aquesta tesi, aporta evidències que suggereixen que la mutació trobada a la subunitat  $\text{Na}_v\beta 2$  del canal de sodi és la causal de la SBr.

Els estudis electrofisiològics han revelat una reducció significativa del  $I_{\text{Na}}$  quan la  $\text{Na}_v1.5$  es coexpressa amb la subunitat  $\beta$ 2D211G comparat amb la subunitat  $\beta$ 2WT, sense afectar les altres propietats biofísiques del canal. Els estudis realitzats per tal de poder explicar per quins mecanismes la mutació podia disminuir la densitat del  $I_{\text{Na}}$ , han demostrat que la reducció del corrent és a causa d'una reducció de la  $\text{Na}_v1.5$  a la superfície cel·lular.

En un estudi de Watanabe i col·laboradors (2009), van estudiar mutacions en el gen *SCN2B* [*SCN2B* p.(Arg28Trp) i p.(Arg28Gln)] responsables de FAF. En comparació amb la  $\text{Na}_v\beta 2$  WT, aquestes mutacions causen una disminució significativa del  $I_{\text{Na}}$ , una desviació a potencials més positius de la corba d'activació depenent de voltatge [en el cas de *SCN2B* p.(Arg28Trp)], i una desviació a potencials més

positius de la corba d'activació i inactivació depenent de voltatge [en el cas de *SCN2B* p.(Arg28Gln)]<sup>92</sup>. Tot i que en l'estudi no es precisa un mecanisme causal de la reducció del  $I_{Na}$ , es discuteix que una reducció de  $I_{Na}$  pot provocar una taquiarítmia que alteri els nivells d'expressió dels canals iònics en els miòcits auriculars, que poden promoure i mantenir una fibril·lació auricular<sup>11,92</sup>.

En la SBr, l'efecte de la reducció del  $I_{Na}$  promoguda per una disminució del canal de sodi cardíac a la superfície cel·lular, seria similar a l'observat en una FAF, però recauria majoritàriament als miòcits ventriculars per observar l'elevació del segment ST característic de la SBr<sup>80,81</sup>.

Diversos estudis demostren que pacients amb SBr poden desenvolupar FAF, i que pacients amb simptomologia de fibril·lació auricular poden acabar desenvolupant un ECG típic de SBr<sup>190,191</sup>. Per tant, encara que la SBr estigui més relacionada a defectes al ventricle pot acabar comportant disfuncions a l'aurícula i viceversa. Aquest fet explica que mutacions a la subunitat *SCN2B*, o a les subunitats  $Na_v\beta$  en general, puguin desenvolupar FAF o SBr amb un mecanisme similar, ja que és coherent amb el que s'observa clínicament<sup>92,191,192</sup>.

D'altra banda, mutacions a les subunitats  $Na_v\beta1b$  i  $Na_v\beta3$  també s'han relacionat com a possibles causals de la SBr.

Les tres mutacions estudiades de la  $Na_v\beta1b$  revelen: (1) una disminució de  $I_{Na}$ <sup>141,143,144</sup>; (2) una desviació a potencials més positius de la corba d'activació i inactivació [en la *SCN1Bb* p.(Thr179\*)]<sup>141</sup>; (3) una desviació

a potencials més negatius de la corba d'inactivació depenent de voltatge [la *SCN1Bb* p.(His162Pro)<sup>143</sup>]; (4) una desacceleració de la recuperació de la inactivació [*SCN1Bb* p.(Arg214Gln) i p.(His162Pro)]<sup>143,144</sup>; i (5) la *SCN1Bb* p.(Arg214Gln) també afecta el corrent  $I_{to}$ , augmentant la densitat de corrent i desaccelerant la cinètica d'inactivació<sup>144</sup>.

Els estudis de les mutacions a la  $Na_v\beta 3$  revelen que l'efecte d'aquestes mutacions al corrent i funció del canal de sodi cardíac són: (1) reducció del  $I_{Na}$ , per una alteració del trànsit de la  $Na_v1.5$ <sup>150,151</sup>; (2) desviació de la dependència de voltatge de la inactivació a potencials més negatius [només en el cas de la *SCN3B* p.(Leu10Pro)]<sup>150</sup>; i (3) desacceleració de la recuperació de la inactivació negatius [només la *SCN3B* p.(Leu10Pro)]<sup>150</sup>.

Es pot observar per tant que igual que en el nostre estudi, el mecanisme comú i principal pel qual mutacions a les subunitats  $Na_v\beta$  provoquen SBr és la reducció de  $I_{Na}$ . L'alteració de la resta de les propietats biofísiques del canal, podrien dependre de la localització de la mutació, lligada a la funció i modulació de la corresponent subunitat  $Na_v\beta$ .

### **3. El paper de $Na_v\beta 1b$ i $Na_v\beta 2$ en la regulació de la $Na_v1.5$**

Al llarg de la tesi s'ha pogut observar que aquests últims anys, diversos estudis han fet palesa la importància d'aquestes subunitats en la regulació de la funció cardíaca. Si bé el nostre objectiu principal alhora d'estudiar les subunitats  $Na_v\beta$  ha sigut en relació a les mutacions associades a les canalopaties cardíques i a la MSC, els nostres estudis han proporcionat també nou coneixement respecte al paper de les subunitats  $Na_v\beta 1b$  i la  $Na_v\beta 2$  en la regulació de la funció de la  $Na_v1.5$ .

#### **3.1. La regulació de la subunitat $\beta 1b$ WT a la funció de la $Na_v1.5$**

L'efecte de la  $Na_v\beta 1b$  a les propietats del corrent de sodi, han estat prèviament investigades utilitzant diferents subunitats  $\alpha$  i models cel·lulars<sup>118,119,127,141,144</sup>. Tot i això, l'estudi de l'efecte de la subunitat  $\beta 1b$ WT a la  $Na_v1.5$  es redueix a pocs estudis<sup>141,143,144</sup>, els tres *in vitro* en models cel·lulars HEK tsa201 i CHO, respectivament.

A través dels experiments realitzats en el segon article presentat en aquesta tesi, s'ha observat que la  $Na_v\beta 1b$ WT incrementa  $I_{Na}$ , desvia significativament l'activació i la inactivació dependents de voltatge, i disminueix el número de canals en inactivació lenta.

Respecte a l'increment de la densitat del corrent, els resultats obtinguts són coherents amb els resultats d'altres grups, ja que també observen que la  $\beta 1b$ WT augmenta la densitat del corrent de les subunitats  $\alpha$



$\text{Na}_v1.2$ <sup>118</sup>,  $\text{Na}_v1.3$ <sup>127</sup> i  $\text{Na}_v1.5$ <sup>141,143,144</sup>. Per tant, és clar un efecte de la  $\beta 1\text{bWT}$  en la funció dels canal de sodi incrementant el pic de  $I_{\text{Na}}$ .

Respecte a la resta d'efectes, hi ha divergències. La desviació a potencials més negatius de l'activació depenent de voltatge es pot observar als estudis de Watanabe *et al.* i Yuan *et al.* (en la  $\text{Na}_v1.5$ ), i de Kazen-Gillespie *et al.* (en la  $\text{Na}_v1.2$ )<sup>118,141,143</sup>. En canvi, en els altres estudis no s'observa aquest efecte<sup>119,127,144</sup>.

D'altra banda, l'efecte a la dependència de voltatge de la inactivació també és diferent. En els estudis de Watanabe i Yuan<sup>141,143</sup> observen una desviació a potencials més negatius, mentre que en el nostre estudi la desviació s'observa a potencials més positius.

Igual que en altres estudis, els nostres resultats no han revelat un efecte de la  $\beta 1\text{bWT}$  a la recuperació de la inactivació<sup>118,141</sup>, en canvi Hu *et al.* observen una recuperació més ràpida de la  $\text{Na}_v1.5$  en presència de la  $\beta 1\text{bWT}$ , però Yuan *et al.* observen una recuperació més lenta<sup>143,144</sup>.

En resum, l'efecte de la  $\beta 1\text{bWT}$  a altres propietats biofísiques del canal, a banda de l'increment del  $I_{\text{Na}}$ , no és clar i queden aspectes per resoldre. Part dels motius pels quals es poden donar aquestes divergències són les condicions experimentals i les diferències en les espècies utilitzades (clons i models cel·lulars)<sup>161</sup>.

A la literatura hi ha estudis que utilitzen models animals pel gen *SCN1B*. Aquests però, majoritàriament estan centrats en estudiar els efectes neuronals ja que les subunitats  $\text{Na}_v\beta 1$  està estretament lligada a

epilèpsia i altres canalopaties d'origen neuronal<sup>193-196</sup>. Només l'estudi de López-Santiago *et al.* (2007) analitza els cardiomiòcits de ratolins *SCN1B* KO<sup>97</sup>. En aquest estudi però l'efecte de la  $\text{Na}_v\beta 1$ , és una combinació de la pèrdua d'ambdues isoformes la  $\text{Na}_v\beta 1a$  i  $b$ , i no únicament l'efecte de l'absència o presència de la  $\text{Na}_v\beta 1b$ . Per exemple, demostren que l'absència de les  $\text{Na}_v\beta 1$  augmenta la densitat del corrent de sodi al pic i tardana, i provoca una prolongació del PAC. Aquest efecte és contrari a l'observat en el nostre estudi amb la  $\text{Na}_v\beta 1b$  i en altres estudis amb cèl·lules de mamífers i ovòcits de *Xenopus*, en què majoritàriament s'observa que la  $\text{Na}_v1.5$  sola té menys corrent que la  $\text{Na}_v1.5+\beta 1$ <sup>92,93,102,131,141</sup>. López-Santiago *et al.* discuteixen que podria succeir que l'efecte observat fos per una alteració dels canals de sodi sensibles a TTX del miòcits ventriculars (que correspon a un 20% dels canals de sodi expressats en miòcits cardíacs<sup>197</sup>) i no a la  $\text{Na}_v1.5$ .

D'altra banda, en el nostre estudi no s'han observat diferències en els resultats obtinguts al comparar el  $I_{\text{NaT}}$  de la  $\text{Na}_v1.5$  sola o coexpressada amb la  $\text{Na}_v1.5+\beta 1b\text{WT}$ .

Fins a dia d'avui no hi ha estudis que analitzin directament la modulació del  $I_{\text{NaT}}$  per la  $\text{Na}_v\beta 1b$ , però sí hi ha estudis de l'efecte de la  $\text{Na}_v\beta 1a$  al  $I_{\text{NaT}}$ . El problema principal recau una altra vegada en què els resultats obtinguts són contradictoris, ja que López-Santiago (amb el ratolí *SCN1B* KO)<sup>97</sup> i Valdivia (coexpressant  $\text{Na}_v\beta 1a$  amb  $\text{Na}_v1.5$  en HEK293)<sup>102</sup> demostren que la  $\text{Na}_v\beta 1a$  disminueix el  $I_{\text{NaT}}$ ; en canvi, Maltsev i

col·laboradors, descriuen que la  $\text{Na}_v\beta 1a$  augmenta el  $I_{\text{NaT}}$  de la  $\text{Na}_v1.5$  en HEK tsa201<sup>198</sup>.

En aquest segon estudi de la tesi, s'ha descrit per primera vegada que la  $\text{Na}_v\beta 1b$  té un efecte a la inactivació profunda de la  $\text{Na}_v1.5$ . El 2007, Zimmer i Benndorf van demostrar que la inactivació lenta del canal de sodi era regulada pel C-terminal de la subunitat  $\text{Na}_v\beta 1a$ <sup>145</sup>. Les dues isoformes comparteixen el domini N-terminal de la proteïna, de manera que és poc probable que la regulació de la inactivació profunda en la  $\text{Na}_v\beta 1b$  es produeixi per aquest domini. Per tant, igual que en la isoforma  $\text{Na}_v\beta 1a$ , el més probable que la regulació d'aquesta propietat es dugui a terme a través del C-terminal. La importància del domini C-terminal de les  $\text{Na}_v\beta 1$  també es fa palesa en l'article de Meadows *et al.* (2001). En aquest estudi, la deleció total del C-terminal redueix parcialment la interacció amb la  $\text{Na}_v1.2$  i altera alguna de les propietats el canal, fent evident que no tota la regulació de les  $\text{Na}_v\alpha$  per part de les  $\text{Na}_v\beta 1$  ve donada per la regió extracel·lular, sinó també per la intracel·lular<sup>138</sup>.

Estudis recents determinen que la importància de la subunitat  $\text{Na}_v\beta 1b$  en cor podria ser elevada, ja que s'ha observat que aquesta subunitat estaria significativament més expressada que la  $\text{Na}_v\beta 1a$ , tant en l'aurícula com en ventricle humà<sup>143</sup>. Tot i això, aquests resultats s'haurien de confirmar ja que entren en divergència amb l'estudi de Watanabe<sup>141</sup>.

D'altra banda, són pocs els estudis d'immunolocalització de les subunitats  $\text{Na}_v\beta$  que formen el canals de sodi en cardiomiòcits

humans<sup>133</sup>, o ratolí<sup>132,134</sup>; i en cap d'aquests s'analitza la localització de la subunitat  $\text{Na}_v\beta 1b$  segurament per problemes d'immunodetecció i diferenciació de les subunitats  $\text{Na}_v\beta 1a$  i  $\text{Na}_v\beta 1b$ <sup>143</sup>.

Els estudis futurs podrien anar encarats a optimitzar la diferenciació de les subunitats  $\text{Na}_v\beta 1$ , i juntament amb tècniques electrofisiològiques, esbrinar les diferències degudes a al canvi de seqüència en el C-terminal, en la localització i funció de  $\text{Na}_v\beta 1a$  i  $\text{Na}_v\beta 1b$  sobre la  $\text{Na}_v 1.5$ .

### **3.2. Els efectes de la subunitat $\beta 2$ WT a la funció de la $\text{Na}_v 1.5$**

Els estudis en sistemes d'expressió heteròloga d'altres grups referents al paper de la subunitat  $\text{Na}_v\beta 2$  a la  $\text{Na}_v 1.5$ , mostren evidències que la  $\text{Na}_v\beta 2$  interacciona amb la  $\text{Na}_v 1.5$  directament a la membrana plasmàtica sense cap rol en trànsit d'aquesta proteïna<sup>93</sup>.

Tot i la clara interacció demostrada entre les subunitats  $\text{Na}_v\beta 2$  i  $\text{Na}_v 1.5$ , els estudis fets a diferents laboratoris en relació a la l'efecte d'aquesta subunitat sobre les propietats biofísiques de la  $I_{\text{Na}}$  mostren controvèrsies.

Per una banda, majoritàriament indiquen que la  $\text{Na}_v\beta 2$  no té un efecte en la densitat del  $I_{\text{Na}}$ , tant en la  $\text{Na}_v 1.5$  com en les  $\text{Na}_v 1.1$  i  $\text{Na}_v 1.2$ <sup>92,125,146,147</sup>, però per l'altra, l'efecte de la  $\text{Na}_v\beta 2$  a la dependència de voltatge de les  $\text{Na}_v\alpha$  està clarament en controvèrsia.

Els grups de Chen *et al.* i Malhotra *et al.* no observen un efecte de la subunitat  $\text{Na}_v\beta 2$  a la dependència de voltatge de la  $\text{Na}_v 1.1$ , i  $\text{Na}_v 1.5$ , respectivament<sup>125,132</sup>. En canvi, els grups de Qu *et al.*, Isom *et al.*, i Watanabe *et al.* observen una desviació de la corba de dependència de

voltatge del  $Na_v1.2$  i la  $Na_v1.5$ <sup>92,120,147</sup>. No obstant això, aquestes desviacions ocorren en sentits oposats.

Cal destacar, que l'estudi de Johnson i Bennett mostra diferències significatives en l'efecte de la  $Na_v\beta2$  a la dependència de voltatge a les  $Na_v1.2$  i  $Na_v1.5$ , segons el model cel·lular utilitzat. Aquests estudis demostren que l'efecte d'aquesta subunitat, es troba afectada per la sialització. Per tant, les modificacions posttraduccional, com la sialització, influeixen en l'efecte de la  $Na_v\beta2$  a les propietats biofísiques de les subunitats  $Na_v\alpha$ <sup>146</sup>.

Els nostres estudis realitzats en relació a l'efecte de la subunitat  $Na_v\beta2WT$  sobre la  $Na_v1.5$ , en el nostre model cel·lular (cèl·lules CHO) i en les nostres condicions experimentals, van indicar que la  $Na_v\beta2WT$  no afectava la densitat del corrent, ni les dependències de voltatge de la  $Na_v1.5$  (no publicats). En comparació amb els estudis realitzats amb la  $Na_v1.5$ , els nostres resultats concorden amb l'estudi de Malhotra, però no amb l'estudi de Watanabe que observa una diferència, encara que petita, a la dependència de voltatge de la inactivació<sup>92,132</sup>.

Per tant, la total comprensió de l'efecte de la  $Na_v\beta2WT$  a les propietats biofísiques de la  $Na_v1.5$  resta a l'espera de nous estudis. Possiblement, els estudis en línies cel·lulars més similars a condicions natives, podria evitar les incerteses en els resultats a causa de, per exemple, modificacions posttraduccional tal i com demostren Johnson i Bennett<sup>146</sup>.

En general, els estudis electrofisiològics, d'estructura i localització apunten a que la  $Na_v\beta 2$  i la  $Na_v\beta 4$ , tenen un rol diferent a les subunitats  $Na_v\beta 1$  i  $Na_v\beta 3$ . Com s'ha dit anteriorment, funcionalment no s'observen diferències en la densitat del corrent en coexpressar la  $Na_v\alpha$  amb les subunitats  $Na_v\beta 2$  i la  $Na_v\beta 4$ , però sí que se n'observen en coexpressar-les amb les  $Na_v\beta 1$  i  $Na_v\beta 3$  (múltiples estudis citats al llarg de la tesi). Estructuralment, els estudis evidencien que les subunitats  $Na_v\beta 1$  i  $Na_v\beta 3$  formen enllaços entre elles mateixes que permeten interaccions més complexes amb les  $Na_v\alpha$ , mentre que aquestes no s'observen en les subunitats  $Na_v\beta 2$  i la  $Na_v\beta 4$ <sup>124,129</sup>. En la localització, així com les evidències apunten que les subunitats  $Na_v\beta 2$  i la  $Na_v\beta 4$  interaccionen directament amb les  $Na_v\alpha$  a la membrana plasmàtica, les  $Na_v\beta 1$  i  $Na_v\beta 3$  interaccionen ja en el RE<sup>93,148</sup>.

Respecte a aquesta última evidència, en el nostre article, en analitzar els mecanismes pels quals la mutació  $\beta 2D211G$  provoca la reducció del corrent  $I_{Na}$ , es va observar que era a causa d'una reducció de la  $Na_v1.5$  a la superfície cel·lular.

Els dos possibles mecanismes pels quals la subunitat  $Na_v\beta 2$  pot afectar l'expressió de la  $Na_v1.5$  a la membrana plasmàtica són: (1) una interacció de la mutació en el trànsit de la proteïna del ER a la membrana cel·lular; o (2) una alteració de la mutació a la via de degradació de la  $Na_v1.5$ .

Ara bé, com ja s'ha dit anteriorment els estudis de Zimmer *et al.* (2002) i Laedermann (2013), demostren que és poc probable que la  $Na_v\beta 2$  tingui

un paper en el trànsit de les subunitats  $\text{Na}_v\alpha$ , ja que les evidències indiquen que interaccionen directament a la membrana cel·lular<sup>93,148</sup>. Per tant, els resultats podrien suggerir un possible paper de la  $\text{Na}_v\beta 2$  en la regulació de la internalització de la  $\text{Na}_v 1.5$ .

A la literatura no hi ha estudis en relació aquest possible rol de les  $\text{Na}_v\beta$  però sí en relació a altres proteïnes<sup>166,199,200</sup>. Aquests estudis, han identificat les proteïnes Nedd4 com a reguladores de l'ubiquitinació del canals de sodi via la interacció d'aquestes proteïnes amb el motiu PY de les subunitats  $\text{Na}_v\alpha$ . En concret, a l'estudi de Rougier *et al.* s'observa que la proteïna Nedd4-2 redueix el  $I_{\text{Na}}$  de la  $\text{Na}_v 1.5$  a través d'una reducció del número de canals a la superfície cel·lular<sup>166</sup>.

Una possible explicació de mecanisme similar a la de Rougier *et al.*, seria que la  $\text{Na}_v\beta 2$  té un efecte en el temps de permanència de la  $\text{Na}_v 1.5$  a la membrana. Per tant, la mutació podria afectar aquesta internalització i degradació de la subunitat  $\alpha$ , que podria explicar aquesta reducció de la  $\text{Na}_v 1.5$  a la superfície cel·lular i la corresponent reducció del corrent.

Els estudis futurs podrien anar encaminats en estudiar aquest possible rol, per esbrinar realment quina és la contribució d'aquestes subunitats, en concret de la  $\text{Na}_v\beta 2$ , en aquesta regulació de la degradació i internalització de la  $\text{Na}_v 1.5$ .

Igual que a l'article de Rougier, es podrien fer assajos a diferents temps de l'expressió de  $\text{Na}_v 1.5$  a la superfície cel·lular (en presència o absència de la  $\text{Na}_v\beta 2\text{WT}$ ) tractant les cèl·lules amb Brefeldina A (BFA), un

metabòlit fúngic que inhibeix el transport vesicular i interromp l'aparell de golgi. El tractament amb BFA bloquejaria el trànsit de nous canals a la membrana, i es podria mesurar si es troba modificada el temps de vida mitjà del canal a la membrana<sup>166</sup>.



## **4. Limitacions, perspectives i reptes**

Al llarg de la tesi, s'han anat exposant les limitacions més directes dels nostres i els altres estudis que tenen com a objectiu el diagnòstic genètic dels pacients amb síndromes com la SQTL i la SBr, la identificació de nous gens associats a aquestes malalties, i l'estudi del paper de les subunitats  $Na_v\beta$  i les mutacions *in vitro*.

A continuació, es presenten algunes d'aquestes limitacions, i també les perspectives i reptes de futurs estudis i tècniques que permetran aprofundir en el coneixement i deixar enrere algunes d'aquestes limitacions actuals.

### **4.1. La penetrància incompleta**

En els tres articles presentats d'aquesta tesi s'ha observat penetrància incompleta:

A l'article de l'anàlisi genètica de 115 pacients de SQTL, a 59 pacients se'ls ha identificat mutació a un dels gens majoritaris associats a la malaltia. D'aquests, hi havia 22 famílies disponibles per estudiar la segregació, i s'ha observat penetrància incompleta en 12 mutacions, de les quals la penetrància mitjana de les famílies és del 41,3%.

En l'estudi la mutació *SCN1Bb* p.(Pro213Thr), s'ha observat que la mutació segrega amb el fenotip de la malaltia però amb una penetrància de 50%. Dels 4 membres amb mutació, a dos se'ls ha diagnosticat un QTc llarg i dos presenten un QTc dintre els valors estàndards.

En tercer lloc, a l'estudi de la mutació en el gen *SCN2B* en una pacient amb SBr, s'ha pogut observar que el cas índex és l'única amb SBr tipus 1 diagnosticada.

Tot i les dificultats que genera la penetrància incompleta a l'hora de poder fer les anàlisis de correlació genotip-fenotip; tant la SQTL com la SBr estan caracteritzades per una elevada expressivitat variable i una penetrància incompleta.

En SQTL un 50% de penetrància és consistent amb la penetrància publicada en les famílies amb SQTL, a on està descrit que la penetrància pot variar des d'un 25% a un 100%<sup>16,201,202</sup>.

En SBr, un estudi de Probst *et al.* va revelar que només el 18% dels pacients amb mutació presentaven SBr espontani, i en canvi, després del test d'ajmalina o flecaïnida, la penetrància augmentava a un 61% de pacients amb SBr induït en el ECG<sup>203</sup>. Per tant, no és estrany el 25% de penetrància en la de la nostra família amb la mutació al *SCN2B*, ja que ens basem en els ECG espontanis. És a dir, la falta del test de la ajmalina/flecaïnida en aquesta família és un impediment per aclarir el percentatge de penetrància.

Com s'ha pogut observar a la introducció, tot i que s'han formulat diverses propostes per explicar la penetrància incompleta i l'expressivitat variable, segueix havent-hi moltes preguntes sense resoldre<sup>16</sup>. Els primers estudis d'associació de genoma complet (GWAS) de milers d'individus, ja han trobat variants comunes o conjunts de variants

comunes que poden contribuir, en part, a l'explicació de l'expressivitat variable i la penetrància incompleta de la SBr<sup>77</sup>. Altres estudis també han demostrat associacions de variants comunes en NOS1AP amb prolongació del QT i probabilitat de símptomes<sup>204</sup>.

A la llarga aquests estudis i similars, ens permetran entendre millor els determinants genètics que contribueixen en diversitat d'expressivitat fenotípica o la manca d'expressivitat d'alguns SBr o SCTL.

#### **4.2. La superposició fenotípica**

A l'estudi de la mutació  $\beta$ 2D211G, el pare de la cas índex no presenta un diagnòstic de SBr tipus 1 però en canvi presenta un bloqueig atrioventricular de primer grau. La superposició fenotípica entre la SBr i la SPCC és freqüent a la literatura. Aquest tipus de superposició, no és insòlita ja que la superposició a les famílies es pot explicar per una mateixa mutació ja que una disminució en la funció del canal de sodi cardíac podria provocar tant SBr com SPCC<sup>171</sup>.

Per contra, superposicions fenotípiques de SCTL3/SBr i SCTL3/SPCC, també publicades a la literatura, són degudes a una funció més complexa que equival a una combinació de guany i pèrdua de funció del canal de sodi cardíac<sup>171</sup>.

En el primer article publicat en aquesta tesi, a on es diagnostica la causa genètica de 115 pacients de SCTL, s'han identificat dues mutacions en el *SCN5A* prèviament descrites en relació a SBr i SPCC. Queden moltes preguntes per poder explicar aquesta superposició, com per exemple que

molt membres afectats per mutacions que provoquen un augment i una disminució de la funció no expressen les dues malalties com en el nostre cas<sup>171</sup>.

La presència de mutacions associades a altres malalties, dificulta la decisió en la diagnosi i especialment en la teràpia<sup>16,171,205</sup>, fent necessaris en aquests casos estudis funcionals per determinar la possible causalitat d'aquestes mutacions.

### **4.3. El futur de la diagnosi genètica en les canalopaties**

En els últims anys s'ha avançat molt en el camp de la diagnosi genètica. El fet que cada vegada la diagnosi genètica sigui més econòmica, tant per mètode seqüenciació tradicional com a través de les noves tecnologies de seqüenciació d'alt rendiment, ha facilitat que cada vegada més aquesta estigui dins la pràctica clínica.

D'altra banda, aquesta disminució en el cost també ha facilitat que a través de la recerca s'hagin identificat nous gens i mecanismes relacionats amb aquestes malalties. No obstant això, encara queda un percentatge elevat de pacients falsos negatius, sobretot en la SBr.

En aquesta tesi, s'han identificat les dues mutacions estudiades en zones codificants de dues proteïnes directament associades funcionalment a una modulació del canal de sodi cardíac. Tot i això, en els últims anys també s'està observant que hi ha altres explicacions a la predisposició a les canalopaties, per mutacions en zones no codificants del genoma que regulen al processament, transcripció, i l'estabilitat del RNA missatger

d'aquests canals<sup>206</sup>. En són exemples, SNVs a la regió del promotor del *SCN5A* que afecta directament els nivells d'expressió del gen<sup>207,208</sup>; o SNVs en zones reguladores específiques no codificants com els *enhancers*, que poden trencar la interacció amb els factors de transcripció i alterar la funció cardíaca<sup>79,209</sup>.

Així mateix, SNVs a zones intròniques que alteren el *splicing* alternatiu, o variacions del número de còpies de diversos exons (duplicacions o insercions grans)<sup>210,211</sup>, són també exemples d'alteracions genètiques que amb la seqüenciació tradicional no es podien detectar i que ara poden explicar part dels pacients falsos negatius<sup>46</sup>.

Per tant, en els pròxims anys, amb l'ús de les noves tecnologies de seqüenciació es podrà aprofundir en el coneixement d'aquests altres mecanismes de regulació associats a les canalopaties cardíques, a la identificació de grans duplicacions i insercions, i també a la identificació de nous gens relacionats igual que en aquesta tesi.

D'altra banda, en el primer article es fa palesa la necessitat de poder predir la patogenicitat de les mutacions per poder prendre decisions a la pràctica clínica. Casos índex sense familiars, i un accés limitat a poder realitzar els experiments *in vitro* per observar les alteracions funcionals de la mutació, fa necessari el desenvolupament més eines per tal que la patogenicitat es pugui predir d'una manera més acurada.

El desenvolupament de les eines *in silico* ja existents o noves que incorporin els canvis conformacionals de l'estructura 3D de la proteïna

(quan aquestes s'hagin pogut cristal·litzar)<sup>186</sup>, i altres estudis com el projecte ESP i derivats<sup>45,70</sup>, contribuiran a poder estar més segurs de la patogenicitat de les mutacions, permetran detectar falsos positius, i disminuir el número de mutacions catalogades de significança incerta.

#### **4.4. Estudis de les $\text{Na}_v\beta$ i de mutacions *in vitro* i *in vivo***

Al llarg de la tesi s'ha pogut observar que una de les limitacions més importants és que encara hi ha moltes mancances respecte al paper de les  $\text{Na}_v\beta$  en la modulació i regulació dels canals de sodi, i també d'altres canals<sup>212</sup>. Queda demostrat que no tenen el mateix efecte sobre totes les  $\text{Na}_v\alpha$ , i que l'efecte pot variar en funció dels models cel·lulars, amb l'ús de diferents clons, en comparar entre diferents espècies, o per les condicions dels registre, entre d'altres<sup>90,161</sup>.

A més, altres estudis com els més recents de l'estructura cristal·litzada dels dominis extracel·lulars de les subunitats  $\text{Na}_v\beta3$  i  $\text{Na}_v\beta4$  demostren que el nivell de complexitat d'aquestes subunitats segurament és més elevada que el que es preveia fins ara<sup>124,129</sup>.

D'altra banda, la necessitat de conèixer amb més profunditat el paper d'aquestes subunitats  $\text{Na}_v\beta$  en el canal de sodi cardíac i d'altres  $\text{Na}_v\alpha$ , es fa més palesa quan diversos estudis, inclosos els dos dels treballs d'aquesta tesi, han implicat mutacions en aquestes proteïnes en malalties aritmogèniques i altres malalties relacionades amb una disfunció de cèl·lules excitable com les neurones o les cèl·lules musculars (múltiples treballs ja citats en el transcurs de la tesi).

Els estudis funcionals realitzats amb cèl·lules de mamífers, com els duts a terme en aquesta tesi, permeten aportar evidències de la patogenicitat de la mutació. Ara bé, l'extrapolació al fenotip real ha de ser curiosa, i aquests estudis no són suficients per predir el grau de severitat de la mutació o la possible afectació dels membres portadors.

És per això que, tot i que encara hi ha limitacions, cada vegada es fa més necessari l'estudi d'aquestes subunitats WT i/o mutades en un ambient més fisiològic, com en cèl·lules més similars als cardiomiòcits<sup>95,96</sup>, en models animals<sup>97</sup>, o en miòcits cardíacs derivats de cèl·lules mare pluripotencials<sup>98,99</sup>.

Tot i que els estudis encara són limitats, en els propers anys aquestes noves eines d'estudi, juntament amb els estudis d'estructura, d'expressió i localització, permetran estudiar més a fons aquestes subunitats  $Na_v\beta$ , per tal de seguir aprofundint en el rol d'aquestes proteïnes en la funció i disfunció cardíaca.

## **Conclusions**





## Conclusions

---

1. El nostre estudi d'anàlisi genètica en la població de SCTL determina per una banda que la falta d'associacions genètiques robustes (per clínica poc severa, impossibilitat d'anàlisi de segregació familiar, o limitacions a les eines de predicció *in silico*) complica les decisions mèdiques, i per l'altra, que tal i com esperàvem en plantejar la primera hipòtesi de la tesi, tant en el primer article com l'estudi no inclòs de la població de pacients de SBr, es demostra que un percentatge significatiu de pacients romanen sense mutació després del diagnòstic genètic dels gens majoritaris.
2. Seguidament, el segon i tercer treball presentats confirmen que, en relació a la nostra primera hipòtesi, els pacients sense mutació identificada en els gens majoritaris de SCTL i SBr poden ser portadors, encara que en prevalença baixa, de mutacions als gens que codifiquen per les subunitats  $Na_v\beta$ .
3. Els experiments realitzats en el segon article demostren que les alteracions provocades per la mutació a la  $Na_v\beta1b$  a la funció de la  $Na_v1.5$  és consistent amb el fenotip de SCTL. Aquest estudi,

juntament amb els de segregació i les dades clíniques, suggereixen que la mutació *SCN1Bb* p.(Pro213Thr) és la causa genètica del SQTL en el nostre pacient de 8 anys. Per tant, els nostres resultats aporten evidències per incorporar el gen *SCN1Bb* a la diagnosi genètica dels pacients de SQTL.

4. En el tercer article, els nostres experiments relacionats amb la mutació *SCN2B* p.(Asp211Gly) identificada en una pacient de SBr, aporten evidències que la  $Na_v\beta 2$  mutada altera la  $Na_v 1.5$  disminuint  $I_{Na}$  per una reducció del número de canals a la superfície cel·lular. Per tant, els nostres resultats suggereixen la incorporació del gen *SCN2B* com a un nou gen candidat de SBr.
5. Per tant, en relació a la nostra segona hipòtesi, les mutacions patogèniques en les subunitats  $Na_v\beta$  poden ser responsables de diverses canalopaties cardíques, sent la mutació particular en la subunitat  $Na_v\beta$  la que comporta la malaltia, i no el tipus de subunitat  $Na_v\beta$  mutada.
6. Finalment, els nostres estudis ressalten la importància de continuar en la cerca de nous gens i nous mecanismes que puguin donar resposta al 60-75% de pacients amb SBr i al 20-35% de pacients amb SQTL sense diagnòstic genètic, i aporta més evidències de les bases genètiques de la SBr i la SQTL en relació a una disfunció de la  $Na_v 1.5$ .

## **Bibliografia**



## Bibliografia

---

1. Goldberger JJ, Cain ME, Hohnloser SH *et al*: American Heart Association/American College of Cardiology Foundation/Heart Rhythm Society scientific statement on noninvasive risk stratification techniques for identifying patients at risk for sudden cardiac death: a scientific statement from the American Heart Association Council on Clinical Cardiology Committee on Electrocardiography and Arrhythmias and Council on Epidemiology and Prevention. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society* 2008; **5**: e1-21.
2. Zipes DP, Camm AJ, Borggrefe M *et al*: ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (writing committee to develop Guidelines for Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death): developed in collaboration with the European Heart Rhythm Association and the Heart Rhythm Society. *Circulation* 2006; **114**: e385-484.
3. Priori SG, Altiot E, Blomstrom-Lundqvist C *et al*: Task Force on Sudden Cardiac Death, European Society of Cardiology. *Europace: European pacing*,

- arrhythmias, and cardiac electrophysiology : journal of the working groups on cardiac pacing, arrhythmias, and cardiac cellular electrophysiology of the European Society of Cardiology* 2002; **4**: 3-18.
4. Chugh SS, Reinier K, Teodorescu C *et al*: Epidemiology of sudden cardiac death: clinical and research implications. *Progress in cardiovascular diseases* 2008; **51**: 213-228.
  5. Ackerman MJ, Priori SG, Willems S *et al*: HRS/EHRA expert consensus statement on the state of genetic testing for the channelopathies and cardiomyopathies: this document was developed as a partnership between the Heart Rhythm Society (HRS) and the European Heart Rhythm Association (EHRA). *Europace: European pacing, arrhythmias, and cardiac electrophysiology: journal of the working groups on cardiac pacing, arrhythmias, and cardiac cellular electrophysiology of the European Society of Cardiology* 2011; **13**: 1077-1109.
  6. Wong LC, Behr ER: Sudden unexplained death in infants and children: the role of undiagnosed inherited cardiac conditions. *Europace : European pacing, arrhythmias, and cardiac electrophysiology: journal of the working groups on cardiac pacing, arrhythmias, and cardiac cellular electrophysiology of the European Society of Cardiology* 2014.
  7. Sarquella-Brugada G, Campuzano O, Iglesias A *et al*: Genetics of sudden cardiac death in children and young athletes. *Cardiology in the young* 2013; **23**: 159-173.
  8. Moon RY, Horne RS, Hauck FR: Sudden infant death syndrome. *Lancet* 2007; **370**: 1578-1587.
  9. Tfelt-Hansen J, Winkel BG, Grunnet M, Jespersen T: Cardiac channelopathies and sudden infant death syndrome. *Cardiology* 2011; **119**: 21-33.
  10. Marban E: Cardiac channelopathies. *Nature* 2002; **415**: 213-218.

11. Amin AS, Tan HL, Wilde AA: Cardiac ion channels in health and disease. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society* 2010; **7**: 117-126.
12. Nerbonne JM, Kass RS: Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiological reviews* 2005; **85**: 1205-1253.
13. Keating MT, Sanguinetti MC: Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias. *Cell* 2001; **104**: 569-580.
14. Gollob MH, Blier L, Brugada R *et al*: Recommendations for the use of genetic testing in the clinical evaluation of inherited cardiac arrhythmias associated with sudden cardiac death: Canadian Cardiovascular Society/Canadian Heart Rhythm Society joint position paper. *The Canadian journal of cardiology* 2011; **27**: 232-245.
15. Giudicessi JR, Ackerman MJ: Genetic testing in heritable cardiac arrhythmia syndromes: differentiating pathogenic mutations from background genetic noise. *Curr Opin Cardiol* 2013; **28**: 63-71.
16. Giudicessi JR, Ackerman MJ: Determinants of incomplete penetrance and variable expressivity in heritable cardiac arrhythmia syndromes. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine* 2013; **161**: 1-14.
17. Kapa S, Tester DJ, Salisbury BA *et al*: Genetic testing for long-QT syndrome: distinguishing pathogenic mutations from benign variants. *Circulation* 2009; **120**: 1752-1760.
18. Giudicessi JR, Ackerman MJ: Genotype- and phenotype-guided management of congenital long QT syndrome. *Current problems in cardiology* 2013; **38**: 417-455.
19. Schwartz PJ, Stramba-Badiale M, Crotti L *et al*: Prevalence of the congenital long-QT syndrome. *Circulation* 2009; **120**: 1761-1767.
20. Schwartz PJ, Moss AJ, Vincent GM, Crampton RS: Diagnostic criteria for the long QT syndrome. An update. *Circulation* 1993; **88**: 782-784.
21. Roden DM: Clinical practice. Long-QT syndrome. *N Engl J Med* 2008; **358**: 169-176.



22. Crotti L, Celano G, Dagradi F, Schwartz PJ: Congenital long QT syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 2008; **3**: 18.
23. Goldenberg I, Moss AJ: Long QT syndrome. *Journal of the American College of Cardiology* 2008; **51**: 2291-2300.
24. Morita H, Wu J, Zipes DP: The QT syndromes: long and short. *Lancet* 2008; **372**: 750-763.
25. Rautaharju PM, Surawicz B, Gettes LS *et al*: AHA/ACCF/HRS recommendations for the standardization and interpretation of the electrocardiogram: part IV: the ST segment, T and U waves, and the QT interval: a scientific statement from the American Heart Association Electrocardiography and Arrhythmias Committee, Council on Clinical Cardiology; the American College of Cardiology Foundation; and the Heart Rhythm Society. Endorsed by the International Society for Computerized Electrocardiology. *Journal of the American College of Cardiology* 2009; **53**: 982-991.
26. Schwartz PJ, Crotti L, Insolia R: Long-QT syndrome: from genetics to management. *Circulation Arrhythmia and electrophysiology* 2012; **5**: 868-877.
27. Schwartz PJ, Priori SG, Spazzolini C *et al*: Genotype-phenotype correlation in the long-QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias. *Circulation* 2001; **103**: 89-95.
28. Romano C, Gemme G, Pongiglione R: Rare Cardiac Arrhythmias of the Pediatric Age. li. Syncopal Attacks Due to Paroxysmal Ventricular Fibrillation. (Presentation of 1st Case in Italian Pediatric Literature). *Clin Pediatr (Bologna)* 1963; **45**: 656-683.
29. Jervell A, Lange-Nielsen F: Congenital deaf-mutism, functional heart disease with prolongation of the Q-T interval and sudden death. *Am Heart J* 1957; **54**: 59-68.
30. Wang Q, Curran ME, Splawski I *et al*: Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nature genetics* 1996; **12**: 17-23.

31. Curran ME, Splawski I, Timothy KW, Vincent GM, Green ED, Keating MT: A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell* 1995; **80**: 795-803.
32. Wang Q, Shen J, Splawski I *et al*: SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell* 1995; **80**: 805-811.
33. Wang DW, Yazawa K, George AL, Jr., Bennett PB: Characterization of human cardiac Na<sup>+</sup> channel mutations in the congenital long QT syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996; **93**: 13200-13205.
34. Splawski I, Tristani-Firouzi M, Lehmann MH, Sanguinetti MC, Keating MT: Mutations in the hminK gene cause long QT syndrome and suppress IKs function. *Nature genetics* 1997; **17**: 338-340.
35. Abbott GW, Sesti F, Splawski I *et al*: MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell* 1999; **97**: 175-187.
36. Napolitano C, Priori SG, Schwartz PJ *et al*: Genetic testing in the long QT syndrome: development and validation of an efficient approach to genotyping in clinical practice. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 2005; **294**: 2975-2980.
37. Splawski I, Shen J, Timothy KW *et al*: Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2. *Circulation* 2000; **102**: 1178-1185.
38. Tester DJ, Will ML, Haglund CM, Ackerman MJ: Compendium of cardiac channel mutations in 541 consecutive unrelated patients referred for long QT syndrome genetic testing. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society* 2005; **2**: 507-517.
39. Kapplinger JD, Tester DJ, Salisbury BA *et al*: Spectrum and prevalence of mutations from the first 2,500 consecutive unrelated patients referred for the

- FAMILION long QT syndrome genetic test. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society* 2009; **6**: 1297-1303.
40. Hedley PL, Jorgensen P, Schlamowitz S *et al*: The genetic basis of long QT and short QT syndromes: a mutation update. *Human mutation* 2009; **30**: 1486-1511.
  41. Stattin EL, Bostrom IM, Winbo A *et al*: Founder mutations characterise the mutation panorama in 200 Swedish index cases referred for Long QT syndrome genetic testing. *BMC Cardiovasc Disord* 2012; **12**: 95.
  42. Mohler PJ, Le Scouarnec S, Denjoy I *et al*: Defining the cellular phenotype of "ankyrin-B syndrome" variants: human ANK2 variants associated with clinical phenotypes display a spectrum of activities in cardiomyocytes. *Circulation* 2007; **115**: 432-441.
  43. Limberg MM, Zumhagen S, Netter MF *et al*: Non dominant-negative KCNJ2 gene mutations leading to Andersen-Tawil syndrome with an isolated cardiac phenotype. *Basic research in cardiology* 2013; **108**: 353.
  44. Fukuyama M, Wang Q, Kato K *et al*: Long QT syndrome type 8: novel CACNA1C mutations causing QT prolongation and variant phenotypes. *Europace : European pacing, arrhythmias, and cardiac electrophysiology : journal of the working groups on cardiac pacing, arrhythmias, and cardiac cellular electrophysiology of the European Society of Cardiology* 2014.
  45. Refsgaard L, Holst AG, Sadjadieh G, Haunso S, Nielsen JB, Olesen MS: High prevalence of genetic variants previously associated with LQT syndrome in new exome data. *European journal of human genetics: EJHG* 2012; **20**: 905-908.
  46. Schwartz PJ, Ackerman MJ, George AL, Jr., Wilde AA: Impact of genetics on the clinical management of channelopathies. *Journal of the American College of Cardiology* 2013; **62**: 169-180.
  47. Amin AS, Pinto YM, Wilde AA: Long QT syndrome: beyond the causal mutation. *The Journal of physiology* 2013.

48. Priori SG, Schwartz PJ, Napolitano C *et al*: Risk stratification in the long-QT syndrome. *N Engl J Med* 2003; **348**: 1866-1874.
49. Sauer AJ, Moss AJ, McNitt S *et al*: Long QT syndrome in adults. *Journal of the American College of Cardiology* 2007; **49**: 329-337.
50. Westenskow P, Splawski I, Timothy KW, Keating MT, Sanguinetti MC: Compound mutations: a common cause of severe long-QT syndrome. *Circulation* 2004; **109**: 1834-1841.
51. Mullally J, Goldenberg I, Moss AJ *et al*: Risk of life-threatening cardiac events among patients with long QT syndrome and multiple mutations. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society* 2013; **10**: 378-382.
52. Moss AJ, Goldenberg I: Importance of Knowing the Genotype and the Specific Mutation When Managing Patients with Long QT Syndrome. *Circulation Arrhythmia and electrophysiology* 2008; **1**: 213-226; discussion 226.
53. 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. *Journal of the American College of Cardiology* 1992; **20**: 1391-1396.
54. Antzelevitch C, Brugada P, Brugada J *et al*: Brugada syndrome: a decade of progress. *Circulation research* 2002; **91**: 1114-1118.
55. Brugada P, Benito B, Brugada R, Brugada J: Brugada syndrome: update 2009. *Hellenic journal of cardiology : HJC = Hellenike kardiologike epitheoresi* 2009; **50**: 352-372.
56. Berne P, Brugada J: Brugada syndrome 2012. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* 2012; **76**: 1563-1571.
57. Brugada J, Brugada R, Antzelevitch C, Towbin J, Nademanee K, Brugada P: Long-term follow-up of individuals with the electrocardiographic pattern of right bundle-branch block and ST-segment elevation in precordial leads V1 to V3. *Circulation* 2002; **105**: 73-78.

58. Antzelevitch C, Brugada P, Borggrefe M *et al*: Brugada syndrome: report of the second consensus conference. *Heart rhythm: the official journal of the Heart Rhythm Society* 2005; **2**: 429-440.
59. Brugada R, Brugada J, Antzelevitch C *et al*: Sodium channel blockers identify risk for sudden death in patients with ST-segment elevation and right bundle branch block but structurally normal hearts. *Circulation* 2000; **101**: 510-515.
60. Matsuo K, Kurita T, Inagaki M *et al*: The circadian pattern of the development of ventricular fibrillation in patients with Brugada syndrome. *European heart journal* 1999; **20**: 465-470.
61. Vatta M, Dumaine R, Varghese G *et al*: Genetic and biophysical basis of sudden unexplained nocturnal death syndrome (SUNDS), a disease allelic to Brugada syndrome. *Human molecular genetics* 2002; **11**: 337-345.
62. Probst V, Veltmann C, Eckardt L *et al*: Long-term prognosis of patients diagnosed with Brugada syndrome: Results from the FINGER Brugada Syndrome Registry. *Circulation* 2010; **121**: 635-643.
63. Hiraoka M, Takagi M, Yokoyama Y, Sekiguchi Y, Aihara N, Aonuma K: Prognosis and risk stratification of young adults with Brugada syndrome. *Journal of electrocardiology* 2013; **46**: 279-283.
64. Priori SG, Napolitano C, Gasparini M *et al*: Natural history of Brugada syndrome: insights for risk stratification and management. *Circulation* 2002; **105**: 1342-1347.
65. Kanda M, Shimizu W, Matsuo K *et al*: Electrophysiologic characteristics and implications of induced ventricular fibrillation in symptomatic patients with Brugada syndrome. *Journal of the American College of Cardiology* 2002; **39**: 1799-1805.
66. Chen Q, Kirsch GE, Zhang D *et al*: Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature* 1998; **392**: 293-296.
67. Kapplinger JD, Tester DJ, Alders M *et al*: An international compendium of mutations in the SCN5A-encoded cardiac sodium channel in patients referred for

- Brugada syndrome genetic testing. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society* 2010; **7**: 33-46.
68. Nielsen MW, Holst AG, Olesen SP, Olesen MS: The genetic component of Brugada syndrome. *Frontiers in physiology* 2013; **4**: 179.
69. Hedley PL, Jorgensen P, Schlamowitz S *et al*: The genetic basis of Brugada syndrome: a mutation update. *Human mutation* 2009; **30**: 1256-1266.
70. Risgaard B, Jabbari R, Refsgaard L *et al*: High prevalence of genetic variants previously associated with Brugada syndrome in new exome data. *Clinical genetics* 2013; **84**: 489-495.
71. Amin AS, Asghari-Roodsari A, Tan HL: Cardiac sodium channelopathies. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 2010; **460**: 223-237.
72. Brugada J, Brugada R, Brugada P: Channelopathies: a new category of diseases causing sudden death. *Herz* 2007; **32**: 185-191.
73. Wilde AA, Brugada R: Phenotypical manifestations of mutations in the genes encoding subunits of the cardiac sodium channel. *Circulation research* 2011; **108**: 884-897.
74. Dumaine R, Towbin JA, Brugada P *et al*: Ionic mechanisms responsible for the electrocardiographic phenotype of the Brugada syndrome are temperature dependent. *Circulation research* 1999; **85**: 803-809.
75. Clancy CE, Rudy Y: Na(+) channel mutation that causes both Brugada and long-QT syndrome phenotypes: a simulation study of mechanism. *Circulation* 2002; **105**: 1208-1213.
76. Grant AO, Carboni MP, Neplioueva V *et al*: Long QT syndrome, Brugada syndrome, and conduction system disease are linked to a single sodium channel mutation. *The Journal of clinical investigation* 2002; **110**: 1201-1209.
77. Bezzina CR, Barc J, Mizusawa Y *et al*: Common variants at SCN5A-SCN10A and HEY2 are associated with Brugada syndrome, a rare disease with high risk of sudden cardiac death. *Nature genetics* 2013; **45**: 1044-1049.

78. Lizotte E, Junttila MJ, Dube MP *et al*: Genetic modulation of brugada syndrome by a common polymorphism. *Journal of cardiovascular electrophysiology* 2009; **20**: 1137-1141.
79. van den Boogaard M, Smemo S, Burnicka-Turek O *et al*: A common genetic variant within SCN10A modulates cardiac SCN5A expression. *The Journal of clinical investigation* 2014; **124**: 1844-1852.
80. Antzelevitch C: The Brugada syndrome: diagnostic criteria and cellular mechanisms. *European heart journal* 2001; **22**: 356-363.
81. Meregalli PG, Wilde AA, Tan HL: Pathophysiological mechanisms of Brugada syndrome: depolarization disorder, repolarization disorder, or more? *Cardiovascular research* 2005; **67**: 367-378.
82. Alings M, Wilde A: "Brugada" syndrome: clinical data and suggested pathophysiological mechanism. *Circulation* 1999; **99**: 666-673.
83. Hille B: *Ion channels of excitable membranes*, 3rd edn. Sunderland, Mass.: Sinauer, 2001.
84. Boron WF, Boulpaep EL: *Medical physiology : a cellular and molecular approach*, 2nd edn. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier, 2009.
85. Hodgkin AL, Huxley AF: Action potentials recorded from inside a nerve fiber. *Nature* 1939; **144**: 710–711.
86. Curtis HJ, Cole KS: Membrane action potentials from the squid giant axon. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 1940; **15**: 145–147.
87. Hodgkin AL, Huxley AF: A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of physiology* 1952; **117**: 500-544.
88. Bezanilla F: Ion channels: from conductance to structure. *Neuron* 2008; **60**: 456-468.
89. 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. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 1981; **391**: 85-100.
90. Gutter C, Benndorf K, Zimmer T: Characterization of N-terminally mutated cardiac Na(+) channels associated with long QT syndrome 3 and Brugada syndrome. *Frontiers in physiology* 2013; **4**: 153.
91. Beltran-Alvarez P, Espejo A, Schmauder R *et al*: Protein arginine methyl transferases-3 and -5 increase cell surface expression of cardiac sodium channel. *FEBS letters* 2013; **587**: 3159-3165.
92. Watanabe H, Darbar D, Kaiser DW *et al*: Mutations in sodium channel beta1- and beta2-subunits associated with atrial fibrillation. *Circulation Arrhythmia and electrophysiology* 2009; **2**: 268-275.
93. Zimmer T, Biskup C, Bollensdorff C, Benndorf K: The beta1 subunit but not the beta2 subunit colocalizes with the human heart Na+ channel (hH1) already within the endoplasmic reticulum. *J Membr Biol* 2002; **186**: 13-21.
94. Bennett ES: Isoform-specific effects of sialic acid on voltage-dependent Na+ channel gating: functional sialic acids are localized to the S5-S6 loop of domain I. *The Journal of physiology* 2002; **538**: 675-690.
95. Cerrone M, Lin X, Zhang M *et al*: Missense Mutations in Plakophilin-2 Cause Sodium Current Deficit and Associate with a Brugada Syndrome Phenotype. *Circulation* 2013.
96. Baroni D, Barbieri R, Picco C, Moran O: Functional modulation of voltage-dependent sodium channel expression by wild type and mutated C121W-beta1 subunit. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 2013; **45**: 353-368.
97. Lopez-Santiago LF, Meadows LS, Ernst SJ *et al*: Sodium channel Scn1b null mice exhibit prolonged QT and RR intervals. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2007; **43**: 636-647.



98. Fatima A, Kaifeng S, Dittmann S *et al*: The Disease-Specific Phenotype in Cardiomyocytes Derived from Induced Pluripotent Stem Cells of Two Long QT Syndrome Type 3 Patients. *PloS one* 2013; **8**: e83005.
99. Priori SG, Napolitano C, Di Pasquale E, Condorelli G: Induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in studies of inherited arrhythmias. *The Journal of clinical investigation* 2013; **123**: 84-91.
100. Zhang Z, Zhao Z, Liu Y, Wang W, Wu Y, Ding J: Kinetic model of Nav1.5 channel provides a subtle insight into slow inactivation associated excitability in cardiac cells. *PloS one* 2013; **8**: e64286.
101. Molleman A: *Patch clamping: an introductory guide to patch clamp electrophysiology*. New York: J. Wiley, 2003.
102. Valdivia CR, Nagatomo T, Makielski JC: Late Na currents affected by alpha subunit isoform and beta1 subunit co-expression in HEK293 cells. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2002; **34**: 1029-1039.
103. Valdivia CR, Chu WW, Pu J *et al*: Increased late sodium current in myocytes from a canine heart failure model and from failing human heart. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2005; **38**: 475-483.
104. Song Y, Shryock JC, Belardinelli L: An increase of late sodium current induces delayed afterdepolarizations and sustained triggered activity in atrial myocytes. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2008; **294**: H2031-2039.
105. Catterall WA: Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology. *The Journal of physiology* 2012; **590**: 2577-2589.
106. Zipes DP, Jalife J: *Cardiac electrophysiology : from cell to bedside*, Sixth edition. edn.
107. Hartshorne RP, Catterall WA: The sodium channel from rat brain. Purification and subunit composition. *The Journal of biological chemistry* 1984; **259**: 1667-1675.

108. Hartshorne RP, Messner DJ, Coppersmith JC, Catterall WA: The saxitoxin receptor of the sodium channel from rat brain. Evidence for two nonidentical beta subunits. *The Journal of biological chemistry* 1982; **257**: 13888-13891.
109. Catterall WA: From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 2000; **26**: 13-25.
110. Hartshorne RP, Keller BU, Talvenheimo JA, Catterall WA, Montal M: Functional reconstitution of the purified brain sodium channel in planar lipid bilayers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1985; **82**: 240-244.
111. Brackenbury WJ, Isom LL: Na Channel beta Subunits: Overachievers of the Ion Channel Family. *Front Pharmacol* 2011; **2**: 53.
112. Shy D, Gillet L, Abriel H: Cardiac sodium channel NaV1.5 distribution in myocytes via interacting proteins: the multiple pool model. *Biochimica et biophysica acta* 2013; **1833**: 886-894.
113. Goldin AL, Barchi RL, Caldwell JH *et al*: Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 2000; **28**: 365-368.
114. Goldin AL: Evolution of voltage-gated Na(+) channels. *The Journal of experimental biology* 2002; **205**: 575-584.
115. Payandeh J, Gamal El-Din TM, Scheuer T, Zheng N, Catterall WA: Crystal structure of a voltage-gated sodium channel in two potentially inactivated states. *Nature* 2012; **486**: 135-139.
116. McCusker EC, Bagnieris C, Naylor CE *et al*: Structure of a bacterial voltage-gated sodium channel pore reveals mechanisms of opening and closing. *Nature communications* 2012; **3**: 1102.
117. Isom LL, De Jongh KS, Patton DE *et al*: Primary structure and functional expression of the beta 1 subunit of the rat brain sodium channel. *Science* 1992; **256**: 839-842.

118. Kazen-Gillespie KA, Ragsdale DS, D'Andrea MR, Mattei LN, Rogers KE, Isom LL: Cloning, localization, and functional expression of sodium channel beta1A subunits. *The Journal of biological chemistry* 2000; **275**: 1079-1088.
119. Qin N, D'Andrea MR, Lubin ML, Shafae N, Codd EE, Correa AM: Molecular cloning and functional expression of the human sodium channel beta1B subunit, a novel splicing variant of the beta1 subunit. *Eur J Biochem* 2003; **270**: 4762-4770.
120. Isom LL, Ragsdale DS, De Jongh KS *et al*: Structure and function of the beta 2 subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif. *Cell* 1995; **83**: 433-442.
121. Messner DJ, Catterall WA: The sodium channel from rat brain. Separation and characterization of subunits. *The Journal of biological chemistry* 1985; **260**: 10597-10604.
122. Morgan K, Stevens EB, Shah B *et al*: beta 3: an additional auxiliary subunit of the voltage-sensitive sodium channel that modulates channel gating with distinct kinetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000; **97**: 2308-2313.
123. Yu FH, Westenbroek RE, Silos-Santiago I *et al*: Sodium channel beta4, a new disulfide-linked auxiliary subunit with similarity to beta2. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2003; **23**: 7577-7585.
124. Gilchrist J, Das S, Van Petegem F, Bosmans F: Crystallographic insights into sodium-channel modulation by the beta4 subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013; **110**: E5016-5024.
125. Chen C, Calhoun JD, Zhang Y *et al*: Identification of the Cysteine Residue Responsible for Disulfide Linkage of Na<sup>+</sup> Channel alpha and beta2 Subunits. *The Journal of biological chemistry* 2012; **287**: 39061-39069.

126. Isom LL, Catterall WA: Na<sup>+</sup> channel subunits and Ig domains. *Nature* 1996; **383**: 307-308.
127. Patino GA, Brackenbury WJ, Bao Y *et al*: Voltage-gated Na<sup>+</sup> channel beta1B: a secreted cell adhesion molecule involved in human epilepsy. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 2011; **31**: 14577-14591.
128. Patino GA, Isom LL: Electrophysiology and beyond: multiple roles of Na<sup>+</sup> channel beta subunits in development and disease. *Neurosci Lett* 2010; **486**: 53-59.
129. Namadurai S, Balasuriya D, Rajappa R *et al*: Crystal Structure and Molecular Imaging of the Nav Channel beta3 Subunit Indicates a Trimeric Assembly. *The Journal of biological chemistry* 2014; **289**: 10797-10811.
130. Mercier A, Clement R, Harnois T *et al*: The beta1-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.
131. Qu Y, Isom LL, Westenbroek RE *et al*: Modulation of cardiac Na<sup>+</sup> channel expression in *Xenopus* oocytes by beta 1 subunits. *The Journal of biological chemistry* 1995; **270**: 25696-25701.
132. Dhar Malhotra J, Chen C, Rivolta I *et al*: Characterization of sodium channel alpha- and beta-subunits in rat and mouse cardiac myocytes. *Circulation* 2001; **103**: 1303-1310.
133. Kaufmann SG, Westenbroek RE, Maass AH *et al*: Distribution and function of sodium channel subtypes in human atrial myocardium. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2013; **61**: 133-141.
134. Maier SK, Westenbroek RE, McCormick KA, Curtis R, Scheuer T, Catterall WA: Distinct subcellular localization of different sodium channel alpha and beta subunits in single ventricular myocytes from mouse heart. *Circulation* 2004; **109**: 1421-1427.

135. McCormick KA, Isom LL, Ragsdale D, Smith D, Scheuer T, Catterall WA: Molecular determinants of Na<sup>+</sup> channel function in the extracellular domain of the beta1 subunit. *The Journal of biological chemistry* 1998; **273**: 3954-3962.
136. McCormick KA, Srinivasan J, White K, Scheuer T, Catterall WA: The extracellular domain of the beta1 subunit is both necessary and sufficient for beta1-like modulation of sodium channel gating. *The Journal of biological chemistry* 1999; **274**: 32638-32646.
137. Spampinato J, Kearney JA, de Haan G *et al*: A novel epilepsy mutation in the sodium channel SCN1A identifies a cytoplasmic domain for beta subunit interaction. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2004; **24**: 10022-10034.
138. Meadows L, Malhotra JD, Stetzer A, Isom LL, Ragsdale DS: The intracellular segment of the sodium channel beta 1 subunit is required for its efficient association with the channel alpha subunit. *Journal of neurochemistry* 2001; **76**: 1871-1878.
139. Fahmi AI, Patel M, Stevens EB *et al*: The sodium channel beta-subunit SCN3b modulates the kinetics of SCN5a and is expressed heterogeneously in sheep heart. *The Journal of physiology* 2001; **537**: 693-700.
140. Baroudi G, Carbonneau E, Pouliot V, Chahine M: SCN5A mutation (T1620M) causing Brugada syndrome exhibits different phenotypes when expressed in *Xenopus* oocytes and mammalian cells. *FEBS letters* 2000; **467**: 12-16.
141. Watanabe H, Koopmann TT, Le Scouarnec S *et al*: Sodium channel beta1 subunit mutations associated with Brugada syndrome and cardiac conduction disease in humans. *The Journal of clinical investigation* 2008; **118**: 2260-2268.
142. Zimmer T, Benndorf K: The human heart and rat brain IIA Na<sup>+</sup> channels interact with different molecular regions of the beta1 subunit. *The Journal of general physiology* 2002; **120**: 887-895.

143. Yuan L, Koivumaki J, Liang B *et al*: Investigations of the Navbeta1b sodium channel subunit in human ventricle; functional characterization of the H162P Brugada Syndrome mutant. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2014.
144. Hu D, Barajas-Martinez H, Medeiros-Domingo A *et al*: A novel rare variant in SCN1Bb linked to Brugada syndrome and SIDS by combined modulation of Na(v)1.5 and K(v)4.3 channel currents. *Heart rhythm: the official journal of the Heart Rhythm Society* 2012; **9**: 760-769.
145. Zimmer T, Benndorf K: The intracellular domain of the beta 2 subunit modulates the gating of cardiac Na v 1.5 channels. *Biophys J* 2007; **92**: 3885-3892.
146. Johnson D, Bennett ES: Isoform-specific effects of the beta2 subunit on voltage-gated sodium channel gating. *The Journal of biological chemistry* 2006; **281**: 25875-25881.
147. Qu Y, Curtis R, Lawson D *et al*: Differential modulation of sodium channel gating and persistent sodium currents by the beta1, beta2, and beta3 subunits. *Molecular and cellular neurosciences* 2001; **18**: 570-580.
148. Laedermann CJ, Syam N, Pertin M, Decosterd I, Abriel H: beta1- and beta3-voltage-gated sodium channel subunits modulate cell surface expression and glycosylation of Nav1.7 in HEK293 cells. *Frontiers in cellular neuroscience* 2013; **7**: 137.
149. Olesen MS, Jespersen T, Nielsen JB *et al*: Mutations in sodium channel beta-subunit SCN3B are associated with early-onset lone atrial fibrillation. *Cardiovascular research* 2011; **89**: 786-793.
150. Hu D, Barajas-Martinez H, Burashnikov E *et al*: A mutation in the beta 3 subunit of the cardiac sodium channel associated with Brugada ECG phenotype. *Circulation Cardiovascular genetics* 2009; **2**: 270-278.
151. Ishikawa T, Takahashi N, Ohno S *et al*: Novel SCN3B mutation associated with brugada syndrome affects intracellular trafficking and function of Nav1.5.

- Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* 2013; **77**: 959-967.
152. Valdivia CR, Medeiros-Domingo A, Ye B *et al*: Loss-of-function mutation of the SCN3B-encoded sodium channel  $\beta_3$  subunit associated with a case of idiopathic ventricular fibrillation. *Cardiovascular research* 2010; **86**: 392-400.
153. Wang P, Yang Q, Wu X *et al*: Functional dominant-negative mutation of sodium channel subunit gene SCN3B associated with atrial fibrillation in a Chinese GenID population. *Biochemical and biophysical research communications* 2010; **398**: 98-104.
154. Yu EJ, Ko SH, Lenkowski PW, Pance A, Patel MK, Jackson AP: Distinct domains of the sodium channel  $\beta_3$ -subunit modulate channel-gating kinetics and subcellular location. *The Biochemical journal* 2005; **392**: 519-526.
155. Ko SH, Lenkowski PW, Lee HC, Mounsey JP, Patel MK: Modulation of Na(v)1.5 by  $\beta_1$ - and  $\beta_3$ -subunit co-expression in mammalian cells. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 2005; **449**: 403-412.
156. Hakim P, Gurung IS, Pedersen TH *et al*: Scn3b knockout mice exhibit abnormal ventricular electrophysiological properties. *Progress in biophysics and molecular biology* 2008; **98**: 251-266.
157. Tan BH, Pundi KN, Van Norstrand DW *et al*: Sudden infant death syndrome-associated mutations in the sodium channel  $\beta$  subunits. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society* 2010; **7**: 771-778.
158. Medeiros-Domingo A, Kaku T, Tester DJ *et al*: SCN4B-encoded sodium channel  $\beta_4$  subunit in congenital long-QT syndrome. *Circulation* 2007; **116**: 134-142.
159. Remme CA, Scicluna BP, Verkerk AO *et al*: Genetically determined differences in sodium current characteristics modulate conduction disease severity in mice with cardiac sodium channelopathy. *Circulation research* 2009; **104**: 1283-1292.

160. Li RG, Wang Q, Xu YJ *et al*: Mutations of the SCN4B-encoded sodium channel beta4 subunit in familial atrial fibrillation. *International journal of molecular medicine* 2013; **32**: 144-150.
161. Rook MB, Evers MM, Vos MA, Bierhuizen MF: Biology of cardiac sodium channel Nav1.5 expression. *Cardiovascular research* 2012; **93**: 12-23.
162. Maltsev VA, Kyle JW, Mishra S, Undrovinas A: Molecular identity of the late sodium current in adult dog cardiomyocytes identified by Nav1.5 antisense inhibition. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2008; **295**: H667-676.
163. Adsit GS, Vaidyanathan R, Galler CM, Kyle JW, Makielski JC: Channelopathies from mutations in the cardiac sodium channel protein complex. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2013; **61**: 34-43.
164. Montpetit ML, Stocker PJ, Schwetz TA *et al*: Regulated and aberrant glycosylation modulate cardiac electrical signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009; **106**: 16517-16522.
165. Beltran-Alvarez P, Pagans S, Brugada R: The cardiac sodium channel is post-translationally modified by arginine methylation. *Journal of proteome research* 2011; **10**: 3712-3719.
166. Rougier JS, van Bemmelen MX, Bruce MC *et al*: Molecular determinants of voltage-gated sodium channel regulation by the Nedd4/Nedd4-like proteins. *American journal of physiology Cell physiology* 2005; **288**: C692-701.
167. Vatta M, Ackerman MJ, Ye B *et al*: Mutant caveolin-3 induces persistent late sodium current and is associated with long-QT syndrome. *Circulation* 2006; **114**: 2104-2112.
168. Ueda K, Valdivia C, Medeiros-Domingo A *et al*: Syntrophin mutation associated with long QT syndrome through activation of the nNOS-SCN5A macromolecular complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008; **105**: 9355-9360.



169. Hu RM, Tan BH, Orland KM *et al*: Digenic inheritance novel mutations in SCN5a and SNTA1 increase late I(Na) contributing to LQT syndrome. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2013; **304**: H994-H1001.
170. Wu G, Ai T, Kim JJ *et al*: alpha-1-syntrophin mutation and the long-QT syndrome: a disease of sodium channel disruption. *Circulation Arrhythmia and electrophysiology* 2008; **1**: 193-201.
171. Zimmer T, Surber R: SCN5A channelopathies--an update on mutations and mechanisms. *Progress in biophysics and molecular biology* 2008; **98**: 120-136.
172. London B, Michalec M, Mehdi H *et al*: 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.
173. Kattygnarath D, Maugendre S, Neyroud N *et al*: MOG1: a new susceptibility gene for Brugada syndrome. *Circulation Cardiovascular genetics* 2011; **4**: 261-268.
174. Ishikawa T, Sato A, Marcou CA *et al*: A novel disease gene for Brugada syndrome: sarcolemmal membrane-associated protein gene mutations impair intracellular trafficking of hNav1.5. *Circulation Arrhythmia and electrophysiology* 2012; **5**: 1098-1107.
175. Rivero A, Curtis AB: Sex differences in arrhythmias. *Curr Opin Cardiol* 2010; **25**: 8-15.
176. Itoh H, Shimizu W, Hayashi K *et al*: Long QT syndrome with compound mutations is associated with a more severe phenotype: a Japanese multicenter study. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society* 2010; **7**: 1411-1418.
177. Frousios K, Iliopoulos CS, Schlitt T, Simpson MA: Predicting the functional consequences of non-synonymous DNA sequence variants--evaluation of bioinformatics tools and development of a consensus strategy. *Genomics* 2013; **102**: 223-228.
178. Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP: Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PLoS one* 2012; **7**: e46688.

179. Hu D, Barajas-Martinez H, Nesterenko VV *et al*: Dual variation in SCN5A and CACNB2b underlies the development of cardiac conduction disease without Brugada syndrome. *Pacing Clin Electrophysiol* 2010; **33**: 274-285.
180. Giudicessi JR, Kapplinger JD, Tester DJ *et al*: Phylogenetic and physicochemical analyses enhance the classification of rare nonsynonymous single nucleotide variants in type 1 and 2 long-QT syndrome. *Circulation Cardiovascular genetics* 2012; **5**: 519-528.
181. Nishio Y, Makiyama T, Itoh H *et al*: D85N, a KCNE1 polymorphism, is a disease-causing gene variant in long QT syndrome. *Journal of the American College of Cardiology* 2009; **54**: 812-819.
182. Yoshikane Y, Yoshinaga M, Hamamoto K, Hirose S: A case of long QT syndrome with triple gene abnormalities: Digenic mutations in KCNH2 and SCN5A and gene variant in KCNE1. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society* 2012.
183. Marjamaa A, Newton-Cheh C, Porthan K *et al*: Common candidate gene variants are associated with QT interval duration in the general population. *J Intern Med* 2008.
184. Tester DJ, Ackerman MJ: Genetic testing for potentially lethal, highly treatable inherited cardiomyopathies/channelopathies in clinical practice. *Circulation* 2011; **123**: 1021-1037.
185. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L *et al*: A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature methods* 2010; **7**: 248-249.
186. Juang JM, Lu TP, Lai LC *et al*: Utilizing multiple in silico analyses to identify putative causal SCN5A variants in Brugada syndrome. *Scientific reports* 2014; **4**: 3850.
187. Koopmann TT, Beekman L, Alders M *et al*: Exclusion of multiple candidate genes and large genomic rearrangements in SCN5A in a Dutch Brugada syndrome

- cohort. *Heart rhythm: the official journal of the Heart Rhythm Society* 2007; **4**: 752-755.
188. Clancy CE, Tateyama M, Liu H, Wehrens XH, Kass RS: Non-equilibrium gating in cardiac Na<sup>+</sup> channels: an original mechanism of arrhythmia. *Circulation* 2003; **107**: 2233-2237.
189. Wu J, Naiki N, Ding WG *et al*: A molecular mechanism for adrenergic-induced long QT syndrome. *Journal of the American College of Cardiology* 2014; **63**: 819-827.
190. Pappone C, Radinovic A, Manguso F *et al*: New-onset atrial fibrillation as first clinical manifestation of latent Brugada syndrome: prevalence and clinical significance. *European heart journal* 2009; **30**: 2985-2992.
191. Francis J, Antzelevitch C: Atrial fibrillation and Brugada syndrome. *Journal of the American College of Cardiology* 2008; **51**: 1149-1153.
192. Olesen MS, Holst AG, Svendsen JH, Haunso S, Tfelt-Hansen J: SCN1Bb R214Q found in 3 patients: 1 with Brugada syndrome and 2 with lone atrial fibrillation. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society* 2012; **9**: 770-773.
193. Aman TK, Grieco-Calub TM, Chen C *et al*: Regulation of persistent Na current by interactions between beta subunits of voltage-gated Na channels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2009; **29**: 2027-2042.
194. Chen C, Westenbroek RE, Xu X *et al*: Mice lacking sodium channel beta1 subunits display defects in neuronal excitability, sodium channel expression, and nodal architecture. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2004; **24**: 4030-4042.
195. Patino GA, Claes LR, Lopez-Santiago LF *et al*: A functional null mutation of SCN1B in a patient with Dravet syndrome. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2009; **29**: 10764-10778.

196. Uebachs M, Opitz T, Royeck M *et al*: Efficacy loss of the anticonvulsant carbamazepine in mice lacking sodium channel beta subunits via paradoxical effects on persistent sodium currents. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2010; **30**: 8489-8501.
197. Westenbroek RE, Bischoff S, Fu Y, Maier SK, Catterall WA, Scheuer T: Localization of sodium channel subtypes in mouse ventricular myocytes using quantitative immunocytochemistry. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2013; **64**: 69-78.
198. Maltsev VA, Kyle JW, Undrovinas A: Late Na<sup>+</sup> current produced by human cardiac Na<sup>+</sup> channel isoform Nav1.5 is modulated by its beta1 subunit. *The journal of physiological sciences : JPS* 2009; **59**: 217-225.
199. Fotia AB, Ekberg J, Adams DJ, Cook DI, Poronnik P, Kumar S: Regulation of neuronal voltage-gated sodium channels by the ubiquitin-protein ligases Nedd4 and Nedd4-2. *The Journal of biological chemistry* 2004; **279**: 28930-28935.
200. van Bemmelen MX, Rougier JS, Gavillet B *et al*: Cardiac voltage-gated sodium channel Nav1.5 is regulated by Nedd4-2 mediated ubiquitination. *Circulation research* 2004; **95**: 284-291.
201. Priori SG, Napolitano C, Schwartz PJ: Low penetrance in the long-QT syndrome: clinical impact. *Circulation* 1999; **99**: 529-533.
202. Berge KE, Haugaa KH, Fruh A *et al*: Molecular genetic analysis of long QT syndrome in Norway indicating a high prevalence of heterozygous mutation carriers. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* 2008; **68**: 362-368.
203. Probst V, Wilde AA, Barc J *et al*: SCN5A mutations and the role of genetic background in the pathophysiology of Brugada syndrome. *Circulation Cardiovascular genetics* 2009; **2**: 552-557.

204. Tomas M, Napolitano C, De Giuli L *et al*: Polymorphisms in the NOS1AP gene modulate QT interval duration and risk of arrhythmias in the long QT syndrome. *Journal of the American College of Cardiology* 2010; **55**: 2745-2752.
205. Clancy CE, Kass RS: Defective cardiac ion channels: from mutations to clinical syndromes. *The Journal of clinical investigation* 2002; **110**: 1075-1077.
206. Jagu B, Charpentier F, Toumaniantz G: Identifying potential functional impact of mutations and polymorphisms: linking heart failure, increased risk of arrhythmias and sudden cardiac death. *Frontiers in physiology* 2013; **4**: 254.
207. Bezzina CR, Shimizu W, Yang P *et al*: Common sodium channel promoter haplotype in asian subjects underlies variability in cardiac conduction. *Circulation* 2006; **113**: 338-344.
208. Park JK, Martin LJ, Zhang X, Jegga AG, Benson DW: Genetic variants in SCN5A promoter are associated with arrhythmia phenotype severity in patients with heterozygous loss-of-function mutation. *Heart rhythm: the official journal of the Heart Rhythm Society* 2012; **9**: 1090-1096.
209. van den Boogaard M, Wong LY, Tessadori F *et al*: Genetic variation in T-box binding element functionally affects SCN5A/SCN10A enhancer. *The Journal of clinical investigation* 2012; **122**: 2519-2530.
210. Tester DJ, Benton AJ, Train L, Deal B, Baudhuin LM, Ackerman MJ: Prevalence and spectrum of large deletions or duplications in the major long QT syndrome-susceptibility genes and implications for long QT syndrome genetic testing. *Am J Cardiol* 2010; **106**: 1124-1128.
211. Barc J, Briec F, Schmitt S *et al*: Screening for copy number variation in genes associated with the long QT syndrome: clinical relevance. *Journal of the American College of Cardiology* 2011; **57**: 40-47.
212. Nguyen HM, Miyazaki H, Hoshi N *et al*: Modulation of voltage-gated K<sup>+</sup> channels by the sodium channel beta1 subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012; **109**: 18577-18582.