

DETERMINANTS MOLECULARS DE LA MORT SOBTADA CARDÍACA HEREDITÀRIA EN UNA GRAN FAMÍLIA DE LES ILLES CANÀRIES

Cristina Bosch Calero

Per citar o enllaçar aquest document:
Para citar o enlazar este documento:
Use this url to cite or link to this publication:

<http://hdl.handle.net/10803/406951>

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

Determinants moleculars de la mort sobtada cardíaca hereditària en una gran família de les Illes Canàries

Cristina Bosch Calero

2015



TESI DOCTORAL

**Determinants moleculars de la mort sobtada
cardíaca hereditària en una gran família de les
Illes Canàries**

Cristina Bosch Calero

2015

Programa de Doctorat en Biologia Molecular, Biomedicina i Salut

Dirigida per

Dr. Ramon Brugada i Dr. Guillermo Javier Pérez

Tutor:

Dr. Ramon Brugada

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


1 Annex

Girona, 21 de desembre 2015

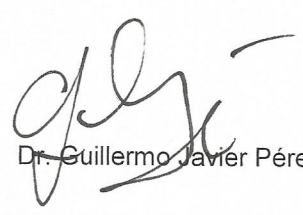
El Dr. **Ramon Brugada Tarradellas**, professor adjunt de la Facultat de Medicina de la Universitat de Girona, director del Centre de Genètica Cardiovascular de l'Institut d'Investigació Biomèdica de Girona i Cardiòleg de l'Hospital Josep Trueta.

El Dr. **Guillermo Javier Pérez**, professor lector Serra Húnter de la Facultat de Medicina de la Universitat de Girona i investigador sènior del Centre de Genètica Cardiovascular.

DECLAREM: Que el treball titulat "**Determinants moleculars de la mort sobtada cardíaca hereditària en una gran família de les Illes Canàries**", que presenta la **Cristina Bosch Calero** per a l'obtenció del títol de doctor/a, ha estat realitzat sota la nostra direcció. I, perquè així consti i tingui els efectes oportuns, signem aquest document.



Dr. Ramon Brugada Tarradellas



Dr. Guillermo Javier Pérez



Cristina Bosch Calero

Agraïments

Ha arribat el moment d'escriure les últimes línies d'aquesta tesi. Les escric amb una barreja de sentiments, per una part, emocionada per haver arribat a aquest punt, i per l'altre, amb certa malenconia per deixar enrere una de les millors etapes de la meua vida. Durant aquests 5 últims anys he crescut professionalment i personalment, en gran part, gràcies a les persones que m'heu envoltat. És per això, que ha arribat al moment d'agrair-vos tot el vostre suport.

En primer lloc, vull agrair als meus directors de tesi, Ramon Brugada i Guillermo Javier Pérez el seu suport en la realització d'aquesta tesi. Ramon, gràcies per deixar-me formar part del Centre de Genètica Cardiovascular i donar-me l'oportunitat de treballar en aquest projecte que m'ha permès aprendre un munt de coses. *A ti, Guille, por enseñarme todas las cosas que he aprendido y contagiarme esa pasión por la investigación. Todos estos años has estado ayudándome y apoyándome en todo lo que he necesitado, trabajar contigo ha sido un placer. Muchas gracias.*

En segon lloc vull agrair a tots els membres del CGC el seu suport. *A ti Fabi, gracias por ayudarme en el proyecto y darme buenos consejos. A*

vosaltres, Sara, Marcel, Pedro, Oscar, Eli, Catarina, Anna I., Rino, Ferran, Irene i Anna petita, per donar-me un cop de mà sempre que ho he necessitat. A les nenes, Mireia, Anna, Mònica i Helena, tot va començar una tarda a la sala de cultius, gràcies per tots els moments professionals i personals viscuts. A la resta de doctors en projecte, Alexandra, Mel·lina, Txus, Bernat, Javi i Olallo, gràcies pel moments viscuts i pel vostre suport, aviat us tocarà a vosaltres, ànims! Als alumnes de pràctiques, en especial a la Natàlia i a la Isabel per la seva col·laboració. Gràcies a tots! Serà difícil trobar uns companys de feina com vosaltres.

En tercer lloc, agrair a tots aquells que, d'una manera o altre, heu col·laborat en aquest projecte, en especial al Dr. Wangüemert, al Dr. Ruiz, al Dr. Josep Brugada i en Carmelo Pérez, sense el treball que heu dut a terme amb els pacients i amb la recerca d'arxius històrics, aquest projecte no hagués estat possible.

En quart lloc, agrair als amics les estones d'esbarjo i desconnexió, a la Raquel, en Serra, als remembers (Laura i Jordi), a l'Ague i en Joan, a la Natalia i en Manolo, en Masmi i l'Esther i a la Cris i en David, aquests últims anys hem compartit molts moments que m'han ajudat a donar embranzida a la tesi.

En cinquè i últim lloc a la meva família. Gràcies, Joan i Anna M^a fa 10 anys que formo part de la vostra família i des de el primer moment m'heu tractat com una filla, gràcies per donar-me la vostra confiança i el vostre suport. Als meus cunyats, Joan i Belen, perquè em recolzeu com els germans que no he tingut mai, i a la petita princesa Mariona, per treure'm un somriure i animar-me cada cop que em dius tieta. A la meva àvia, als avis que no hi són, als meus tiets i cosins perquè, tot i no entendre massa bé el que faig, sempre m'heu recolzat. I per últim i, sense menysprear a ningú, als més importants. A vosaltres Papa i Mama us vull agrair el que sóc, la vostra lluita constant ha fet que hagi pogut arribar fins aquí. Gràcies per estar al meu costat sempre, per donar-me suport incondicional, per encoratjar-me a tirar endavant, per ajudar-me i per estimar-me. A tu Victor per no deixar mai d'estar al meu costat, m'has ajudat a tirar-ho tot endavant i m'has aixecat en els moments en que he estat a punt de tirar la tovallola, tenir un company de viatge com tu és impagable. Gràcies carinyu. I al meu petit príncep, en Marc, vaig començar a escriure la tesi quan estaves a la panxa de la mama, així que, en part, és teva. Tu, amb el teu somriure i alegria, m'has acabat de donar l'energia necessària en aquesta última fase, fas que les coses siguin més fàcils del que semblen. Gràcies petit!

A tots vosaltres gràcies, gràcies i gràcies!

Per la meva petita gran família

Llistat de publicacions derivades de la tesi

Wangüemert F.*, Bosch Calero C.*, Pérez C., Campuzano O., Beltran-Alvarez P., Scornik FS., Iglesias A., Berne P., Allegue C., Ruiz Hernandez P., Brugada J., Pérez GJ., Brugada R. *Clinical and molecular characterization of a cardiac ryanodine receptor founder mutation causing catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia*. Heart Rhythm. 2015.

*Coautors

Llista d'abreviatures

[Ca²⁺]_c	Concentració de calci citosòlic
[Ca²⁺]_{SR}	Concentració de calci intraluminal o al reticle sarcoplasmàtic
ADN	Àcid desoxiribonucleic
AMPc	Adenosin monofosfat cíclic
ApoCAM	Calmodulina lliure de Ca ²⁺
CaCAM	Calmodulina unida a Ca ²⁺
CASQ2	Calseqüestrina
CAM	Calmodulina
CAMKII	Proteïna quinasa Ca ²⁺ /Calmodulina
CICR	<i>Calcium induced calcium release</i>
CMC	4-chloro-m-cresol
Condel	<i>CONsensus DELeterioriousness score of non-synonymous single nucleotide</i>
CPVT	Taquicàrdia ventricular polimòrfica catecolaminèrgica
DAVD	Displàsia aritmogènica del ventricle dret
DAD	<i>Delayed Afterdepolarizations</i> o Post-despolaritzacions tardanes
dbSNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism database</i>
dNTP	Desoxinucleòtids
EC₅₀	<i>Maximal effective concentration</i> o concentració màxima efectiva

E-C	Excitació contracció
ECG	Electrocardiograma
Em	Potencial de membrana
EADs	<i>Early Afterdepolarizations</i> o Post-despolaritzacions tardanes
FV	Fibril·lació ventricular
g	Conductància unitària
Hg19	<i>Human genome 19</i>
HGMD	<i>Human gen mutation database</i>
I	Intensitat de corrent
I_{Na}	Corrent de sodi
I_{CaL}	Corrent de calci depenent de voltatge
I_f	<i>Funny current</i>
I_{to}	Corrent transitori sortint de potassi
I_K	Corrent de potassi
I_{K1}	Corrent rectificador de potassi
IV	Intensitat-Voltatge
KRH	Krebs-Ringer-Hepes
LTCC	Canals de Ca ²⁺ dependents de voltatge
LQT	<i>Long QT Syndrome</i> o Síndrome del QT llarg

LC-MS/MS	Espectrometria de masses en tàndem acoblada a un sistema de cromatografia en fase líquida
MSC	Mort sobtada cardíaca
MAF	Freqüència de l'al·lel minoritari
MALDI-TOFF	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight</i>
MT	Mutant
NSA	Nòdul sinoauricular
NCX	Intercanviador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$
NGS	<i>Next generation sequencing</i> o tècniques de seqüenciació de nova generació
PA	Potencial d'acció
PAC	Potencial d'acció cardíac
PKA	Proteïna quinasa A
PLB	Fosfolamban
Po	Probabilitat d'obertura
Polyphen-2	POLYmorphism PHEnotyping v2
ROI	Regió d'interès
RyR	Receptor de rianodina
RyR1	Receptor de rianodina tipus 1
RyR2	Receptor de rianodina tipus 2

RyR3	Receptor de rianodina tipus 3
SR	Reticle sarcoplasmàtic
STR	<i>Short tandem repeats</i>
SOICR	<i>Store Overload Induced Ca²⁺ release</i>
SIFT	<i>Sorting Intolerant from Tolerant</i>
TVB	Taquicàrdia ventricular bidireccional
TVP	Taquicàrdia ventricular polimòrfica
V	Voltatge
WT	<i>Wild Type</i> o salvatge

Índex de Figures

Figura 1. Representació esquemàtica del cor.....	19
Figura 2. Potencial d'acció cardíac.....	22
Figura 3. Acoblament excitació contracció.....	24
Figura 4. Estimulació dels receptors β -adrenèrgics.....	34
Figura 5. Prova d'esforç d'un pacient amb CPVT.....	37
Figura 6. Registre de canal únic de RyR2.....	50
Figura 7. Estructura del RyR1.....	54
Figura 8. Complex macromolecular del RyR2.....	61
Figura 9. Mecanismes de generació d'arítmies en CPVT.....	81
Figura 10. Pedigrís de les famílies amb alta incidència de MSC.....	87
Figura 11. Pedigrí de la gran família de l'illa de Gran Canària.....	88
Figura 12. Immunofluorescència de cèl·lules HEK293 _{RyR2} WT o G357S.....	109
Figura 13. Western blot de la proteïna RyR2 en lisats de cèl·lules HEK293 _{RyR2} WT o G357S.	112
Figura 14. Dot blot contra RyR2 de les fraccions obtingudes del purificació per gradient continu de sacarosa.....	115
Figura 15. Gel de la immunoprecipitació de RyR2.....	126
Figura 16. Pedigrí de família del cas índex.....	135
Figura 17. Electroferograma de la mutació G357S.....	135
Figura 18. Famílies incloses a l'estudi de lligament.....	138

Figura 19. Haplotips i recombinacions als dos nuclis familiars..	140
Figura 20. Lod score dels marcadors STR's inclosos a l'estudi de lligament.	142
Figura 21. Registre de canals únics RyR2 G357S.....	148
Figura 22. Corba IV del canal RyR2 G357S.	148
Figura 23. Imatges representatives de fluorescència de Ca ²⁺ en resposta a la cafeïna.	151
Figura 24. Traços de fluorescència representatius de les oscil·lacions de Ca ²⁺ induïdes per cafeïna.....	151
Figura 25. Corbes dosi-resposta a cafeïna..	152
Figura 26. Traços de fluorescència i activitat SOICR en cèl·lules HEK _{RyR2} WT i G357S.	155
Figura 27. Corbes dosi-resposta de l'activitat SOICR en cèl·lules HEK _{RyR2} WT i G357S.	156
Figura 28. Detecció per western blot de la proteïna RyR2 i fosforilació de la S2808.	160
Figura 29. Nivell de fosforilació de la S2808 de RyR2 a diferents concentracions de forskolina.	160
Figura 30. Traços de fluorescència de l'activitat SOICR en HEK293 _{RyR2} WT o G357S a diferents concentracions de forskolina.....	163
Figura 31. Activitat SOICR a diferents concentracions de forskolina.....	163
Figura 32. Traços de fluorescència representatius de les oscil·lacions de Ca ²⁺ induïdes per cafeïna en condicions mimètiques a estrès.	166
Figura 33. Corba dosi resposta a cafeïna en condicions mimètiques a estrès.....	166
Figura 34. Traços de fluorescència de l'activitat SOICR en absència i presència de forskolina.	169
Figura 35. Amplitud de les oscil·lacions de Ca ²⁺	169

Figura 36. Anàlisi de l'activitat SOICR a diferents concentracions de Ca^{2+} en condicions mimètiques a estrès.	170
Figura 37. Cobertura de la proteïna RyR2 G357S després de l'anàlisi per LD-MS/MS.	172
Figura 38. Espectre de masses dels pèptids WT i MT.....	175
Figura 39. Espectre de masses del pèptid RyR2 obtingut en LC-MS/MS.	177
Figura 40. Ubicació de la regió dels residus S357 i S359 a l'estructura del RyR1.	195

Índex de Taules

Taula 1. Gens associats a CPVT	41
Taula 2. Components de la Reacció en Cadena de la Polimerasa	96
Taula 3. Perfil Reacció en Cadena de la Polimerasa	97
Taula 4. Reacció de seqüenciació	98
Taula 5. Perfil de la reacció de seqüenciació	98
Taula 6. Panell de 55 gens associats a MSC	101
Taula 7. Marcadors Short Tandem Repeats (STR)	104
Taula 8. Components PCR amb KAPA2G Robust HotStart ADN Polymerase	105
Taula 9. Perfil de PCR en Touchdown	105
Taula 10. Tampons per a Western Blot	111
Taula 11. Composició del gels d'acrilamida per a Western blot	111
Taula 12. Tampons per a la purificació de RyR2 en gradient de sacarosa	114
Taula 13. Tampó Krebs-Ringer-Hepes (KRH)	119
Taula 14. Variants trobades al cas índex dels gens RyR2 i CASQ2	136
Taula 15. Lod score dels marcadors STR's inclosos a l'estudi de lligament	141
Taula 16. Variants compartides entre afectats al gen RyR2	143
Taula 17. Series iòniques identificades en el pèptid MT analitzat per LC-MS/MS	176

Índex de contingut

Agraïments.....	I
Llistat de publicacions derivades de la tesi	X
Llista d'abreviatures	XII
Índex de Figures	XVI
Índex de Taules.....	XIX
Índex de contingut	xx
Resum.....	1
Resumen	5
Summary	9
I. Introducció	15
1. Mort sobtada cardíaca.....	15
2. Activitat elèctrica i contràctil del cor	19
2.1. Potencial d'acció cardíac.....	20
2.2. Acoblament excitació contracció	23
2.2.1. Senyals de Ca ²⁺ intracel·lular.....	25
2.2.2. Calcium induced calcium release.....	26
2.2.3. Recaptació i extracció de Ca ²⁺	27
2.2.4. Finalització de la sortida de Ca ²⁺ del reticle	28
2.2.5. Store Overload Induced Ca ²⁺ Release.....	29
2.3. Estimulació beta adrenèrgica del miòcit cardíac	31
3. Taquicàrdia ventricular polimòrfica catecolaminèrgica	35

3.1.	Característiques clíniques i diagnòstic de la malaltia.....	36
3.2.	Genètica de la CPVT	38
3.3.	Diagnòstic genètic en CPVT.....	41
3.4.	Tractament de la malaltia	42
3.5.	Estratificació del risc i relació fenotip- genotip en CPVT.....	43
3.6.	Penetrància i expressivitat de la malaltia	45
4.	El Receptor de Rianodina tipus 2.....	47
4.1.	Propietats biofísiques del RyR2	48
4.2.	Estructura del RyR2.....	50
4.3.	Relació estructura - funció del RyR2	55
4.4.	Regulació del RyR2	56
4.4.1.	Lligants endògens	57
4.4.2.	Lligants exògens.....	59
4.4.3.	Complex macromolecular del RyR2.....	60
4.4.3.1.	Calmodulina.....	62
4.4.3.2.	FKBP12.6	63
4.4.3.3.	Proteïnes que fosforilen el RyR2: CAMKII i PKA	64
4.4.3.4.	Calseqüestrina, Junctina i Triadina	68
5.	Alteracions funcionals del RyR2 i aritmogènesi	70
5.1.	Mutacions al RyR2.....	70
5.2.	Conseqüències funcionals de les mutacions al RyR2.....	71

5.2.1.	Alteració de la sensibilitat pel Ca ²⁺	72
5.2.2.	Mecanismes moleculars de la disfunció del RyR2	73
5.2.2.1.	Domain Unzipping	74
5.2.2.2.	Desestabilització de la unió entre FKBP12.6 i RyR2	75
5.3.	Mecanismes de generació d'arítmies en CPVT	76
II.	Plantejament de la recerca, hipòtesis i objectius	85
III.	Material i mètodes	93
1.	Estudi genètic	93
1.1.	Pacients i controls	93
1.2.	Extracció de ADN genòmic	94
1.3.	Amplificació , purificació i seqüenciació Sanger dels gens RyR2 i CASQ2	95
1.4.	Seqüenciació de 55 gens associats a MSC per NGS	99
1.5.	Estudis <i>in silico</i>	101
1.6.	Anàlisi de marcadors STR's	103
1.7.	Anàlisi de lligament genètic	105
2.	Estudi de la funció del canal RyR2	107
2.1.	Cultius cel·lulars	107
2.2.	Anàlisi de l'expressió de RyR2 per immunofluorescència	108
2.3.	Anàlisi d'expressió de RyR2 per western blot	109
2.4.	Purificació de RyR2 en gradient de sacarosa continu	113
2.5.	Dot blot	114
2.6.	Registres de canals únics en bicapes lipídiques artificials	116

2.7.	Imatges de calci intracel·lular	118
2.8.	Anàlisi de sensibilitat a cafeïna	119
2.9.	Anàlisi de l'activitat SOICR.....	121
2.10.	Anàlisi de la fosforilació del residu S2808 del RyR2.....	122
2.11.	Anàlisi estadística.....	123
3.	Anàlisi de proteòmica del RyR2.....	125
3.1.	Immunoprecipitació.....	125
3.2.	Anàlisi de fosforilació per LC/MS-MS del canal RyR2	127
3.3.	Assaigs de fosforilació in vitro	129
IV.	Resultats.....	133
1.	Estudi genètic.....	133
1.1.	Estudi genètic de gens associats a CPVT en el cas índex	134
1.2.	Test genètic en cascada dels familiars.....	137
1.3.	Anàlisi de lligament de la regió cromosòmica 1q41-1q44.....	138
1.4.	Estudi de polimorfismes dels gens <i>RyR2</i> i <i>CASQ2</i> entre pacients afectats	143
1.5.	Estudi genètic de 55 gens associats a MSC en el cas índex.....	145
2.	Estudi de la funció del canal RyR2	146
2.1.	Estudi de la funció del canal en condicions basals	146
2.1.1.	Conductància del canal RyR2 G357S.....	146
2.1.2.	Anàlisi de sensibilitat a cafeïna	149
2.1.3.	Anàlisi de l'activitat SOICR.....	152

2.2.	Estudi de la funció del canal en condicions mimètiques a estrès β -adrenèrgic..	157
2.2.1.	Acció de la forskolina en cèl·lules HEK293 _{RyR2}	158
2.2.1.1.	Fosforilació de la Serina 2808 del RyR2 per efecte de la forskolina	158
2.2.1.2.	Acció de la forskolina en l'activitat SOICR	161
2.2.2.	Anàlisi de sensibilitat a cafeïna en condicions mimètiques a estrès.....	164
2.2.3.	Anàlisi de l'activitat SOICR en condicions mimètiques a estrès	167
3.	Anàlisi de proteòmica del canal RyR2	171
3.1.	Anàlisi de fosforilació de la proteïna RyR2 G357S en presència de forskolina ..	171
3.2.	Assaig de fosforilació in vitro en pèptids sintètics	173
V.	Discussió	181
1.	Causa genètica de la CPVT a la família de les Illes Canàries	182
2.	Mecanismes de patogenicitat associats a la mutació G357S.....	188
2.1.	Funció del canal RyR2 G357S en condicions basals.....	188
2.2.	Funció del canal RyR2 G357S en condicions mimètiques a estrès.....	190
2.3.	Conseqüències funcionals de la mutació G357S.....	196
VI.	Conclusions	205
VII.	Bibliografia	209
Annex 1	223

Resum

La taquicàrdia ventricular polimòrfica catecolaminèrgica (CPVT) és una malaltia associada a mort sobtada cardíaca (MSC), que es caracteritza per la presència de taquicàrdies ventriculars polimòrfiques i/o bidireccionals induïdes per catecolamines durant estrès emocional o físic. La CPVT és una malaltia hereditària que, principalment, s'ha relacionat amb defectes genètics als gens que codifiquen pel receptor de rianodina tipus 2 (RyR2) i per la calseqüestrina cardíaca (CASQ2), proteïnes implicades en la homeòstasi del Ca^{2+} intracel·lular dels miòcits cardíacs.

Entre el 50% i el 60% dels casos de CPVT són causats per mutacions al RyR2. El RyR2 és un canal de Ca^{2+} de la membrana del reticle sarcoplasmàtic que juga un paper fonamental en l'acoblament excitació-contracció del miòcit cardíac. El RyR2 és el canal responsable de la sortida de Ca^{2+} del reticle a cada batec cardíac. Estudis *in vitro*, mostren que les mutacions al RyR2 alteren la sensibilitat del canal pel Ca^{2+} de l'interior del reticle augmentat la sortida de Ca^{2+} per sobrecàrrega del reticle (SOICR). L'augment d'aquesta activitat, produeix una desregulació de la homeòstasi de Ca^{2+} intracel·lular que promou l'extrusió electrogènica de Ca^{2+} a través del intercanviador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrana plasmàtica i que pot produir despolaritzacions tardanes que

generin un focus arítmic. Tot i que aquest és el mecanisme més descrit per les mutacions al RyR2, no totes les mutacions alteren la funcionalitat del canal de la mateixa manera, fet que assenyala la importància de caracteritzar cel·lular i molecularment les mutacions al RyR2 i aprofundir en els mecanismes de patogenicitat de les mutacions en CPVT.

Aquesta tesi parteix de la identificació d'una gran família a les Illes Canàries, formada per més de 1400 membres, amb una llarga història de MSC en individus molt joves. Un total de 36 familiars han patit MSC, en circumstàncies d'estrès emocional o físic, amb una mitjana d'edat de 18 ± 8 anys. Les circumstàncies de les morts i els estudis clínics realitzats indiquen que la malaltia que pateixen és la CPVT.

L'objectiu principal d'aquesta tesi és determinar la causa genètica de la CPVT en aquesta família i determinar els mecanismes cel·lulars i moleculars pels quals aquesta mutació produeix el fenotip en els pacients.

La causa genètica de la malaltia s'ha determinat mitjançant la realització d'una anàlisi genètica dels principals gens associats a CPVT i a MSC. Aquesta anàlisi ens ha permès la identificació de la mutació G357S al gen *RyR2* en els individus afectats. El locus de la malaltia ha estat confirmat, a posteriori, mitjançant una anàlisi de lligament genètic. La identificació de la mutació ha permès la realització d'un estudi genètic de

1445 familiars, dels quals, 199 han resultat ser portadors vius de la mutació G357S. Aquesta anàlisi ha permès la identificació de individus asimptomàtic en risc de patir MSC, als que s'ha aplicat un seguiment i un tractament profilàctic, que ha evitat la MSC.

Els mecanismes de patogenicitat associats a la mutació G357S s'han determinat a partir de l'estudi funcional del canal mitjançant cèl·lules HEK293 que expressen de manera estable i induïble el RyR2 normal o el RyR2 amb la mutació G357S. A partir d'aquest model hem avaluat diferents propietats funcionals del canal, tant en condicions basals, com en condicions mimètiques a estimulació dels receptors β -adrenèrgics (i.e., activitat de l'adenilat ciclasa augmentada amb l'agonista forskolina). Aquests estudis demostren que, només en presència de forskolina, la mutació G357S produeix un augment de sensibilitat a cafeïna i una major activitat SOICR. En aquest sentit, hem avaluat si la mutació G357S introdueix un nou lloc de fosforilació per PKA, mitjançant l'anàlisi dels pèptids sintètics de la regió de la mutació tractats amb PKA. Els resultat indiquen que la mutació G357S introdueix un nou lloc de fosforilació al residu S359, fet que podria explicar com el tractament amb forskolina, que promou l'activació de la PKA, produeix l'augment d'activitat del canal G357S . Tot i això, l'estructura del canal homòleg RyR1 indica que és poc probable que aquesta fosforilació es pugui donar *in vivo*.

L'estudi realitzat en aquesta tesi proporciona evidències mecanístiques que permeten establir un enllaç entre la mutació G357S del canal RyR2 i la CPVT que pateixen els membres de la gran família de les Illes Canàries. Aquesta tesi dona suport a l'ús de la genètica per identificar individus en risc de patir MSC per tal de implantar un tractament profilàctic de la malaltia i evitar la MSC. El fet que la patogenicitat de la mutació només es desemmascari sota condicions mimètiques a estimulació dels receptors β -adrenèrgics, pot ajudar a explicar el fenotip variable i la penetrància incompleta de la malaltia en aquesta família. Aquesta tesi aporta evidències que permeten ampliar el coneixement dels mecanismes moleculars pels quals les mutacions al RyR2 alteren la homeòstasi del Ca^{2+} intracel·lular i promouen una activitat aritmogènica.

Resumen

La taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (CPVT) es una enfermedad asociada a muerte súbita cardíaca (MSC), que se caracteriza por la presencia de taquicardias ventriculares polimórficas y / o bidireccionales inducidas por catecolaminas durante estrés emocional o físico. La CPVT es una enfermedad hereditaria que, principalmente, se ha relacionado con defectos genéticos en los genes que codifican para el receptor de rianodina tipo 2 (*RyR2*) y para la calsequestrina cardíaca (*CASQ2*), proteínas implicadas en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular de los miocitos cardíacos.

Entre el 50% y el 60% de los casos de CPVT están causados por mutaciones en el gen *RyR2*. El *RyR2* es un canal de Ca^{2+} de la membrana del retículo sarcoplasmático que juega un papel fundamental en el acoplamiento excitación-contracción del miocito cardíaco. El *RyR2* es el canal responsable de la salida de Ca^{2+} de retículo en cada latido cardíaco. Estudios *in vitro* han demostrado que las mutaciones en *RyR2* alteran la sensibilidad del canal por el Ca^{2+} del interior del retículo y aumentan la salida de Ca^{2+} por sobrecarga del retículo (SOICR). El aumento de esta actividad produce irregularidades en la homeostasis de Ca^{2+} intracelular, que promueven la extrusión electrogénica de Ca^{2+} a

través del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrana plasmática, que puede producir despolarizaciones tardías que generen un foco arrítmico. Aunque este es el mecanismo más descrito para las mutaciones en *RyR2*, se ha demostrado que no todas las mutaciones alteran la funcionalidad del canal de la misma manera, señalando la importancia de caracterizar celular y molecularmente las mutaciones en *RyR2* para profundizar en los mecanismos de patogenicidad asociados a las mutaciones que causan CPVT.

Esta tesis parte de la identificación de una gran familia en las Islas Canarias, formada por más de 1.400 miembros, con una larga historia de MSC en individuos muy jóvenes. Un total de 36 familiares han sufrido MSC, en circunstancias de estrés emocional o físico, con una edad media de 18 ± 8 años. Las circunstancias de las muertes y los estudios clínicos realizados indican que la enfermedad que padecen es CPVT.

El objetivo principal de esta tesis es determinar la causa genética de la CPVT en esta familia y determinar los mecanismos celulares y moleculares por los que esta mutación produce el fenotipo arritmogénico en los pacientes.

La causa genética de la enfermedad se ha determinado mediante la realización de un análisis genético de los principales genes asociados a CPVT y MSC. Este análisis nos ha permitido identificar la presencia de la

mutación G357S del gen *RyR2* en los individuos afectados. El locus de la enfermedad ha sido confirmado, a posteriori, mediante un análisis de ligamiento genético. La identificación de la mutación ha permitido la realización de un estudio genético de 1445 familiares, de los cuales, 199 han resultado ser portadores vivos de la mutación G357S. Este análisis ha permitido identificar a los individuos asintomáticos en riesgo de sufrir MSC, a los que se les ha aplicado un seguimiento i un tratamiento profiláctico, que ha evitado la MSC.

Los mecanismos patogénicos asociados a la mutación G357S se han determinado a partir del estudio funcional del canal mediante células HEK293 que expresan de manera estable e inducible el RyR2 normal o el RyR2 con la mutación G357S. A partir de este modelo hemos evaluado diferentes propiedades funcionales del canal, tanto en condiciones basales, como en condiciones miméticas a la estimulación de los receptores β -adrenérgicos (i.e., actividad del adenilato ciclasa aumentada con el agonista forskolina). Estos estudios demuestran que, solo en la presencia de forskolina, la mutación G357S produce un aumento de sensibilidad del canal a cafeína y una mayor actividad SOICR. En este sentido, hemos evaluado si la mutación G357S introduce un nuevo sitio de fosforilación por PKA mediante el análisis de péptidos sintéticos de la región de la mutación. Los resultados de este estudio

indican que la mutación G357S introduce un nuevo sitio de fosforilación para PKA en el residuo S359, lo que podría explicar cómo el tratamiento de forskolina, que promueve la activación de la PKA, aumenta la actividad del canal G357S. Sin embargo, la estructura del canal homólogo RyR1 indica que es poco probable que esta fosforilación se pueda dar *in vivo*.

El estudio realizado en esta tesis proporciona evidencias mecanísticas que permiten establecer un vínculo entre la mutación G357S del canal RyR2 y la CPVT que sufren los miembros de una gran familia de las Islas Canarias. Esta tesis apoya el uso de la genética para identificar individuos en riesgo de sufrir MSC e implantar un tratamiento profiláctico de la enfermedad y evitar la MSC. El hecho de que la patogenicidad de la mutación sólo se desenmascare bajo condiciones miméticas a estimulación de los receptores β -adrenérgicos, puede ayudar a explicar el fenotipo variable y la penetrancia incompleta de la enfermedad en esta familia. Esta tesis aporta evidencias que permiten ampliar el conocimiento de los mecanismos moleculares por los que las mutaciones en RyR2 alteran la homeostasis del Ca^{2+} intracelular y promueven una actividad aritmogénica.

Summary

Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT) is a sudden cardiac death (SCD) associated disease characterized by the presence of bidirectional or polymorphic ventricular tachycardia during emotional or physical stress. CPVT is an inherited disease associated with genetic defects in genes that codify for the ryanodine receptor type 2 (RyR2) and for calsequestrin 2 (CASQ2). Both proteins are involved in the intracellular Ca^{2+} homeostasis of cardiac myocytes.

Between 50% and 60% of CPVT cases are caused by mutations in the *RyR2* gene. The RyR2 is Ca^{2+} channel located in the sarcoplasmic reticulum (SR) membrane. This channel plays a fundamental role in the excitation-contraction coupling in cardiac myocytes. The RyR2 is the channel that mediates the release of Ca^{2+} from the SR in every heartbeat. *In vitro* studies have shown that mutations in RyR2 modify the intraluminal Ca^{2+} sensitivity of the channel, increasing the store overload induced Ca^{2+} release activity (SOICR). This spontaneous activity produces an abnormal intracellular Ca^{2+} homeostasis, which could promote the electrogenic extrusion of Ca^{2+} by the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in the plasma membrane. This mechanism elicits delayed after-depolarizations that, in turn, could generate arrhythmic foci. This is the

most common mechanism described for RyR2 mutations in CPVT. However, not all RyR2 mutations modify the function of the channel in the same way, making imperative the functional and molecular analysis of RyR2 mutations to delve into their pathogenic mechanisms.

This thesis starts with the identification of a large family in the Canary Islands, with more than 1400 members, with a long history of SCD in the youth. A total of 36 relatives had suffered SCD during emotional or physical stress with a mean age of 18 ± 8 years. The circumstances of the deaths and the clinical studies suggested that they suffered CPVT.

The main objective of this thesis is to identify the genetic cause of CPVT in this family, and to determine the cellular and molecular mechanisms by which the mutation produces the arrhythmogenic phenotype of the patients.

The genetic cause of the disease was determined by performing genetic analysis of key genes associated with CPVT and SCD. This analysis allowed us to identify the presence of the G357S mutation in the RyR2 gene in the affected patients. The disease locus was subsequently confirmed by linkage analysis. The identification of the mutation allowed us to realize a genetic study in 1445 family members, 199 of were found to be live genetic carriers of the G357S mutation. This analysis has

allowed the identification of asymptomatic genetic carriers for clinical follow-up and prophylactic treatment to prevent SCD.

Pathogenic mechanisms associated with the G357S mutation were studied using HEK293 cells engineered to express WT or mutated RyR2 channels. With this model, we evaluated different functional properties of the channel, in basal conditions and in conditions that mimic catecholaminergic stress (i.e., increased adenylyl cyclase activity with the agonist forskolin). These studies demonstrate that the G357S mutation increases the caffeine sensitivity and the SOICR activity of the channel, only when forskolin is present. We assessed if the G357S mutation introduces a new phosphorylation site in the channel analyzing synthetic peptides from the region of the mutation. The results indicate that the G357S mutation introduces a new phosphorylation site for protein kinase A in the S359 residue. This could explain how the forskolin treatment, in promoting PKA activation leads to channel activation. However, the recent resolved structure of the RyR1 channel indicates that this phosphorylation is unlikely to be given *in vivo*.

The study performed in this thesis provides mechanistic evidence to establish the link between the G357S mutation of the RyR2 channel and the CPVT of the members of the large family of the Canary Islands. This thesis supports the use of genetic testing to identify individuals at risk of

SCD and to establish a prophylactic treatment to avoid the SCD. The fact that conditions that mimic β -adrenergic stimulation unmask the pathogenic mechanisms of the G357S mutation could explain the incomplete penetrance and the variable phenotype of the CPVT in this family. The evidence presented in this thesis shed light into the mechanisms by which RyR2 mutations may promote arrhythmogenic intracellular Ca^{2+} handling.

I. Introducció

I. Introducció

1. Mort sobtada cardíaca

La mort sobtada cardíaca (MSC) és una de les principals causes de mort als països desenvolupats. És la mort natural inesperada per causes cardíques que té lloc de manera ràpida, en individus aparentment sans, en els que la pèrdua de consciència succeeix en un període breu des de l'inici dels símptomes. La definició més acceptada determina que la pèrdua de consciència succeeix, com a màxim, després d'una hora de l'inici dels símptomes.¹⁻³

La incidència de la MSC varia segons les diferents definicions temporals, però es calcula que als Estats Units oscil·la entre 180.000 i 450.000 casos per any. Els estudis prospectius més recents, que engloben dades de diferents poblacions als Estats Units, Europa i Àsia defineixen que la taxa de mortalitat per MSC varia entre 50 i 100 casos per cada 100.000 habitants, evidenciant, que la incidència de la MSC en població general és elevada.^{2,3}

La majoria de les MSC (75-80%) es produeixen com conseqüència d'una fibril·lació ventricular (FV), un trastorn del ritme cardíac que comporta la pèrdua total de la contracció cardíaca. Mentre que la resta, entre un 15 i

un 20%, es produeixen per bradiarítmies. Aquests ritmes cardíacs anòmals, es donen com a resultat de dos factors, un substrat i un factor desencadenant. El substrat es refereix a la presència d'alguna malaltia cardíaca. I el factor desencadenant, a un factor extern que incita la inestabilitat cardiovascular en el subjecte, com per exemple, factors que augmenten l'activitat simpàtica. La presència d'un substrat i un factor desencadenant pot provocar arítmies i MSC.^{1,2,4}

La causa o substrat més comú de la MSC en l'adult, és la malaltia coronària, que engloba entre el 75% i el 80% dels casos de MSC.^{2,5} Tot i això la malaltia coronària té una baixa incidència en individus joves, on la causa principal de la MSC són les anomalies genètiques dels gens relacionats amb l'estructura o amb l'excitabilitat i/o contracció del cor.⁵

Entre un 10% i un 15% de les MSC són conseqüència de **cardiomiopaties**, malalties que tenen una base genètica i que es caracteritzen per la presència d'anomalies estructurals al cor. Les principals cardiomiopaties són, la cardiomiopatia hipertròfica, la cardiomiopatia dilatada, la displàsia aritmogènica del ventricle dret i les malalties infiltratives del miocàrdi.²

Tant les cardiomiopaties com la malaltia coronària, mostren anomalies estructurals al cor que poden explicar la causa de la MSC en una autòpsia. Però existeix un nombre significant de MSC, sobretot en individus joves, que queden sense resoldre per l'absència d'anomalies

estructurals en el cor. En aquests casos, la causa de la MSC pot ser una alteració elèctrica causada per un grup de malalties genètiques anomenades **canalopaties**. Les canalopaties engloben el 5% de les MSC i, com s'ha esmentat, són malalties elèctriques que no comporten anomalies estructurals en el cor. Les principals canalopaties, descrites fins al moment, són la síndrome de Brugada, la síndrome de QT llarg (LQT), la síndrome QT curt i la taquicàrdia ventricular polimòrfica catecolaminèrgica (CPVT, de l'anglès Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia) que, com veurem més endavant, és el nucli del present projecte.²

Les canalopaties són malalties rares i hereditàries que es produeixen per la presència de mutacions en gens que codifiquen per canals iònics, per les seves subunitats o per proteïnes que regulen la funció del canal, i que contribueixen a la formació del potencial d'acció cardíac (PAC) i a l'acoblament excitació-contracció (E-C) dels miòcits cardíacs. Així doncs, anomalies en els corrents generats per aquest canals, ja sigui per un canvi en les propietats biofísiques o en els seus nivells d'expressió, poden alterar el PAC i/o l'acoblament E-C i provocar trastorns en el ritme cardíac que desencadenin en una MSC.

Aquestes trastorns es poden detectar a partir de patrons anòmals a l'electrocardiograma (ECG) que, juntament amb la història clínica i la història familiar, permeten diagnosticar la malaltia. Tot i això, la diagnosi

és sovint complicada, ja que, la MSC pot ser el primer símptoma d'aquestes malalties.^{6,7} En aquest sentit, els avenços en les anàlisis genètiques han permès un gran progrés en la diagnosi de les canalopaties. La identificació d'un defecte genètic en algun canal iònic, juntament amb el diagnòstic clínic i la història familiar, ajuda al diagnòstic d'aquestes malalties. A més, el caire familiar d'aquestes malalties permet la identificació d'individus en risc de patir un esdeveniment fatal que comporti la MSC.³

El correcte batec del cor depèn d'una correcta generació i propagació de l'impuls elèctric i d'un correcte acoblament entre aquest impuls i la contracció del múscul cardíac. Aquests mecanismes, bàsics en la generació de cada batec cardíac i que fallen en el context de les canalopaties, seran detallats en el pròxim capítol.

2. Activitat elèctrica i contràctil del cor

Cada batec del cor s'origina gràcies a un impuls elèctric que s'inicia en el nòdul sinoauricular (NSA). Aquest impuls es propaga per tot el cor estimulant el miòcits cardíacs i produint la seva contracció. L'impuls elèctric del NSA es genera gràcies a les cèl·lules marcapassos, cèl·lules que tenen activitat automàtica intrínseca per generar potencials d'acció. Un cop generat, aquest impuls elèctric, es propaga per les aurícules produint la despolarització dels miòcits auriculars i la contracció de les aurícules. L'impuls arriba al nòdul auriculoventricular i es distribueix pel Feix de His fins arribar a les fibres de Purkinje, provocant la despolarització dels miòcits ventriculars i la contracció dels ventricles (Figura 1).⁸

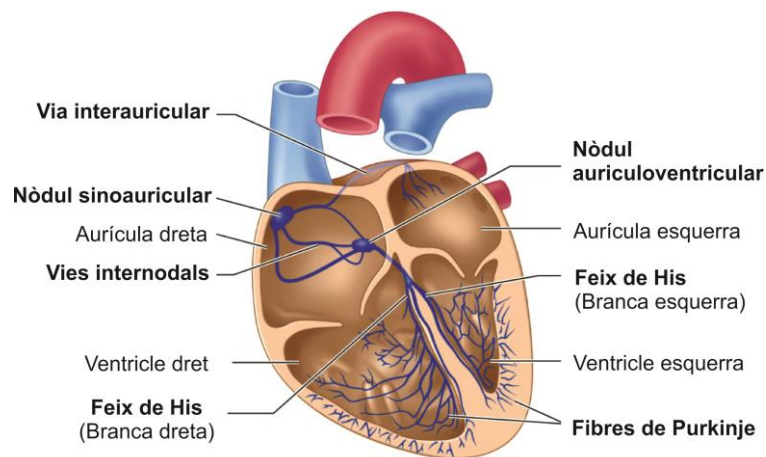


Figura 1. Representació esquemàtica del cor. En blau, sistema de conducció elèctrica del cor. Imatge modificada de Studyblue.(2005). Studyblue, physiology, chapter 9. Recuperat de www.studyblue.com

El batec del cor es genera a partir de l'acoblament E-C que succeeix a cada miòcit cardíac durant sístole. En aquest moment, els miòcits cardíacs experimenten un canvi elèctric o PAC que provoca la despolarització de la cèl·lula i que acaba provocant la contracció del miòcit cardíac.

2.1. Potencial d'acció cardíac

El PAC es defineix com el conjunt de canvis elèctrics en el potencial de membrana cel·lular (E_m), provocats per interacció de diversos canals iònics, que produeix la despolarització del miòcit cardíac. La forma del PAC és diferent a les diverses regions del cor com a conseqüència de les diferències en l'expressió i en les propietats biofísiques dels canals. Les diferències morfològiques contribueixen a la correcta i unidireccional propagació de l'excitació en el miocardi, a través de les unions GAP dels miòcits cardíacs.^{8,9}

L'ona de despolarització del PAC es divideix en 5 fases que són conseqüència de l'activació i inactivació de diferents canals iònics i que produeixen corrents entrants o corrents sortints. Un corrent entrant o despolaritzant és defineix com l'entrada de ions positius a dins de la cèl·lula, mentre que, un corrent sortint o repolaritzant es defineix com la sortida de ions positius a l'exterior cel·lular. La direcció d'aquests corrents ve determinada pel gradient electroquímico de cada ió, de manera que els

corrents de Na^+ (I_{Na}) i Ca^{+2} (I_{Ca}) són corrents entrants i els corrents de K^+ (I_{to} , I_{K} i I_{K1}) són corrents sortints. La interacció d'aquests corrents genera les 5 fases del PAC que són: Fase 0 o de despolarització, Fase 1 o de repolarització parcial, Fase 2 o fase plateau, Fase 3 o de repolarització cel·lular i Fase 4 o de repòs (**Figura 2**).

El PAC s'inicia amb la despolarització de la membrana (Fase 0) gràcies a l'activació dels canals de Na^+ dependents de voltatge. La seva obertura produeix una ràpida entrada de Na^+ (I_{Na}) que provoca que el E_m passi dels -85mV (fase de repòs, diàstole) a $+40\text{mV}$. Un cop la cèl·lula està completament despolaritzada, la inactivació dels canals de Na^+ i l'activació dels canals K^+ , responsables del corrent transitori de K^+ (I_{to}), produeixen una lleugera repolarització del miòcit que conforma la Fase 1 del PAC. La fase plateau o fase 2, es produeix per el balanç entre l'entrada Ca^{2+} (I_{CaL}), a través dels canals de Ca^{2+} tipus L (LTCC), i la sortida K^+ , a través de canals de K^+ , que generen un corrent rectificador sortint (I_{K}). La completa repolarització de la membrana, es produeix a la fase 3 i es don com a conseqüència de la inactivació dels canals LTCC, i a l'activació de diversos canals de K^+ que incrementen la sortida d'aquest ió a l'exterior cel·lular i provoquen la completa repolarització del miòcit. En aquest moment (Fase 4) el E_m es torna a situar als -85mV i es manté estable gràcies al corrent rectificador de K^+ (I_{K1}). El miòcit cardíac resta en

aquesta fase (diàstole) fins que torna a ser estimulat en el següent batec cardíac i es torna a produir la despolarització (sístole).^{7,8}

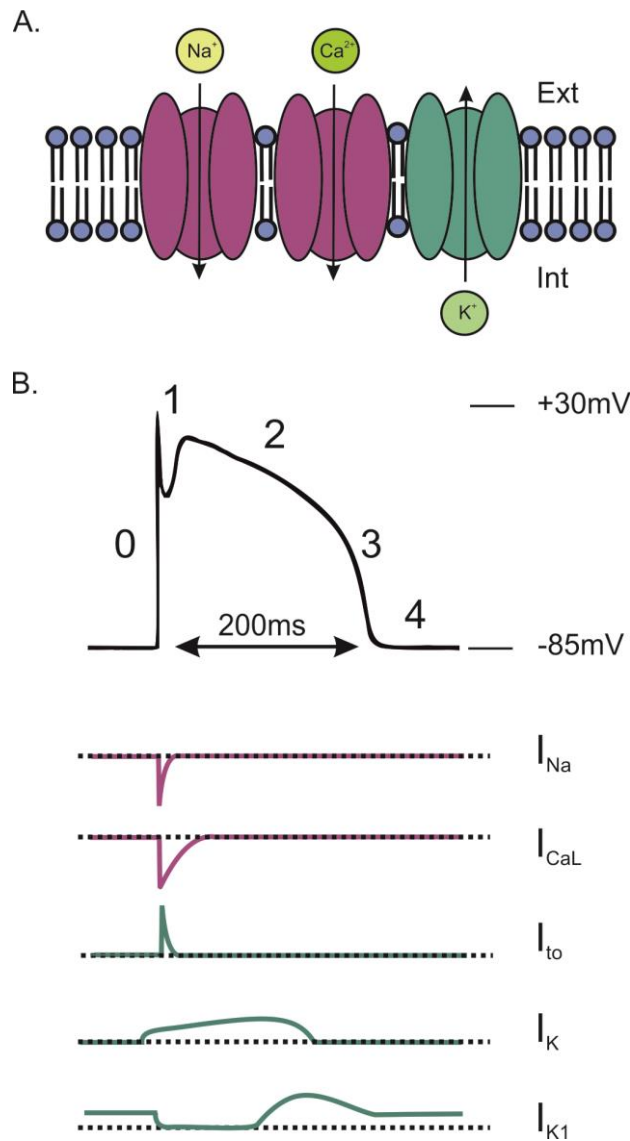


Figura 2. Potencial d'acció cardíac. Representació del PAC ventricular generat per l'entrada de Na^+ , Ca^{2+} i la sortida de K^+ a través dels corresponents canals de la membrana plasmàtica (A). Fases del PAC i els diferents corrents que el generen, en lila els corrents entrants o despolaritzants (I_{Na} , I_{CaL}), en verd els corrents sortints (I_{to} , I_{K} , I_{K1}) (B).

2.2. Acoblament excitació contracció

L'acoblament E-C és el procés per el qual l'estimulació elèctrica del miòcit cardíac inicia la seva contracció a cada batec del cor. En aquest procés el Ca^{2+} és essencial, tant per l'estimulació elèctrica del miòcit com per l'activació dels miofilaments que produiran la seva contracció.¹⁰

En diàstole, el Ca^{2+} es troba principalment al reticle sarcoplasmàtic (SR), el gran reservori de Ca^{2+} intracel·lular. En sístole, durant la fase plateau del PAC, s'activen els canals de Ca^{2+} LTCC dependents de voltatge i es produeix l'entrada de Ca^{2+} al citoplasma (I_{CaL}). L'entrada de Ca^{2+} , provoca la sortida de Ca^{2+} de l'interior del reticle sarcoplasmàtic a través dels receptors de rianodina tipus 2 (RyR2), que són canals iònics de la membrana del SR sensibles a Ca^{2+} . Així doncs, l'entrada de Ca^{2+} produeix la sortida de Ca^{2+} del reticle, fenomen que en anglès s'anomena "*Calcium induced calcium release*" (CICR). El Ca^{2+} alliberat a través d'aquests canals s'uneix a la Troponina C, proteïna que forma part del sarcòmer provocant la separació dels complexos troponina-tropomiosina, de manera que, els llocs d'unió de la miosina a la molècula d'actina queden lliures i les dos proteïnes interaccionen produint la contracció del miòcit. Quan la contracció finalitza, la relaxació es produeix gràcies a la disminució del Ca^{2+} al citosol, una part torna al SR per la bomba SERCA2, i l'altre surt a l'espai extracel·lular gràcies a l'intercanviador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) i a l'ATPasa del sarcolemma (**Figura 3**).^{10,11}

La homeòstasi del Ca^{2+} intracel·lular és de vital importància perquè es produeixi l'acoblament E-C del miòcit cardíac. Els principals mecanismes involucrats en aquesta homeòstasi es detallaran a continuació.

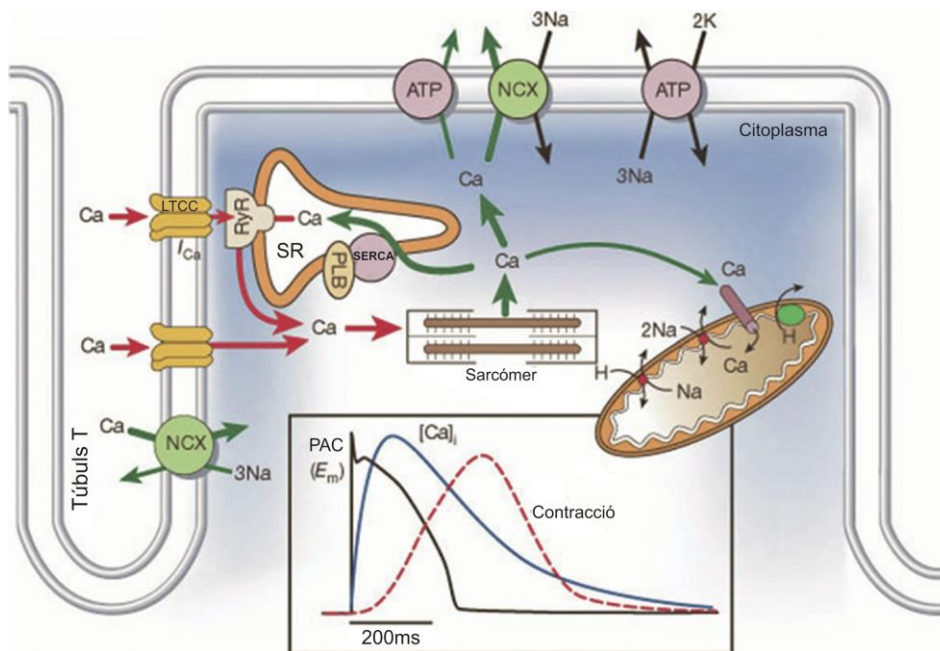


Figura 3. Acoblament excitació contracció. Representació d'un miòcit cardíac i els principals responsables de l'acoblament excitació contracció. L'entrada de Ca^{2+} és representada amb línies vermelles i la recaptació o extracció amb línies verdes. A l'índex es representa, el potencial d'acció cardíac (PAC), l'augment de la concentració de Ca^{2+} durant l'acoblament E-C i la contracció del miòcit. NCX, intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$; LTCC, canals de Ca^{2+} tipus L; RyR2, Receptor de Rianodina tipus 2; PLB, fosfolamban; ATP, ATPasa del sarcolemma; SR, reticle sarcoplasmàtic. Adaptada de Bers D. *Nature*. (2002).

2.2.1. Senyals de Ca^{2+} intracel·lular

En general, el Ca^{2+} és un important segon missatger cel·lular, que regula diversos processos en la cèl·lula, com l'apoptosis, la proliferació cel·lular, l'expressió de gens i la contracció de les cèl·lules musculars. Aquestes senyals, es produeixen per un ràpid increment de la concentració Ca^{2+} al citoplasma ($[Ca^{2+}]_c$), que en estat basal, es situa aproximadament entre 20 i 50nM. L'elevació del Ca^{2+} intracel·lular es pot donar per l'entrada de ions Ca^{2+} , des de fora de la cèl·lula, mitjançant els canals de Ca^{2+} de la membrana plasmàtica, o bé, per la sortida de Ca^{2+} dels compartiments cel·lulars que actuen de reservoris de Ca^{2+} , com el SR, on la concentració Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_{RS}$) es situa entre 0.1 i 2 mM.^{12,13}

En particular, en el miòcit cardíac, l'increment de la $[Ca^{2+}]_c$ durant l'acoblament E-C es deu, principalment, a la sortida de Ca^{2+} de l'interior del SR a través dels RyR2. En els miòcits cardíac l'elevació de Ca^{2+} citosòlic depèn molt del nombre de canals RyR2 activats, que a la vegada, depèn de la concentració local de Ca^{2+} citosòlic, pròxima al canal. L'activació d'un únic canal produeix una petita elevació de Ca^{2+} molt localitzada anomenada Ca^{2+} *quark*, que augmenta la concentració local fins a 30nM i no passa de 1 μ m de diàmetre. L'activació de diversos RyR2 pròxims produeixen un increment major en la concentració de Ca^{2+} local que pot arribar fins a 100-300nM en 2 μ m de diàmetre i que s'anomena Ca^{2+} *sparks*. Si aquests es donen simultàniament i en suficient

proximitat, poden activar els canals pròxims i provocar una onada de Ca^{2+} , que s'estendrà per tota la cèl·lula. Aquesta onada, produirà un augment global en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ que permetrà la contracció del miòcit cardíac.¹⁴

2.2.2. Calcium induced calcium release

L'estructura de túbuls T del miòcit cardíac, fa que els canals LTCC de la membrana plasmàtica estiguin molt a prop del SR, on s'hi troben els RyR2. L'espai situat entre la membrana plasmàtica i el SR s'anomena espai diàdic i pren especial importància en el CICR. En aquest espai, la densitat de canals LTCC de la membrana plasmàtica és alta i es situen just a davant dels RyR2 del SR, que també s'acumulen en aquest espai. Durant el PAC els canals LTCC, dependents de voltatge, s'activen, de manera que la concentració de Ca^{2+} en aquests espais diàdics augmenta fins arribar a $>100\mu\text{M}$, concentració suficient per activar un grup de canals RyR2. Aquesta activació produirà un *spark* de Ca^{2+} que activarà els canals RyR2 més pròxims produint l'onada de Ca^{2+} que es propagarà per tota la cèl·lula i incrementarà la concentració de Ca^{2+} global fins, aproximadament, $1\mu\text{M}$. El Ca^{2+} s'unirà a la Troponina C del sarcòmer i es produirà la contracció del miòcit cardíac.^{11,15}

2.2.3. Recaptació i extracció de Ca^{2+}

Després de la contracció de miòcit cardíac, un 70% del Ca^{2+} alliberat és recaptat per la bomba SERCA2 a l'interior del reticle. La resta s'extreu a l'exterior cel·lular per NCX i l'ATPasa del sarcolemma.

La bomba SERCA2 és una ATPasa de Ca^{2+} situada a la membrana del SR que transporta activament el Ca^{2+} cap al seu interior. L'elevada densitat d'aquesta proteïna a la membrana del reticle, on el 80% de les proteïnes són bombes SERCA2, permet que amb un o dos cicles de transport de Ca^{2+} es recuperi la concentració basal de Ca^{2+} al citoplasmàtica.¹⁰ En el cardiomiòcit, la bomba SERCA2 està inhibida per la proteïna fosfolamban (PLB). Aquesta proteïna pot ser fosforilada per la proteïna quinasa A (PKA), de manera que, quan es fosforila redueix la seva interacció amb la bomba i aquesta incrementa el transport de Ca^{2+} cap a l'interior del SR.^{9,12} A l'interior del reticle, el Ca^{2+} s'uneix a la calseqüestrina (CASQ2), proteïna que té una gran afinitat pel Ca^{2+} i que actua de tampó de Ca^{2+} a l'interior del SR. La CASQ2 es troba molt a prop de la membrana del SR i juntament amb el RyR2, la junctina i la triadina formen un complex multiproteic que regula la sensibilitat del RyR2 pel Ca^{2+} intraluminal.¹⁶

Tot i que la major part del Ca^{2+} alliberat durant l'acoblament E-C és recaptat cap a l'interior del SR, una part d'aquest Ca^{2+} és extret cap a l'exterior cel·lular. L'intercanviador NCX duu a terme la major part

d'aquesta extracció, tot i que l'ATPasa de la membrana plasmàtica també hi col·labora.^{10,15} L'intercanviador NCX intercanvia 3 ions Na^+ per un ió de Ca^{2+} a través de la membrana plasmàtica de miòcit cardíac. La direcció de l'intercanvi $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ depèn de les concentracions d'aquests dos ions en el medi extracel·lular i en el citoplasma. Així doncs, després de l'alliberació de Ca^{2+} del SR, quan el nivell de Ca^{2+} del citoplasma és molt elevat, l'intercanviador NCX entra Na^{2+} al citoplasma i extreu Ca^{2+} a l'exterior cel·lular. Tot i que aquest mecanisme afavoreix la relaxació del miòcit cardíac, és un mecanisme electrogènic que provoca canvis en el potencial de membrana.¹²

2.2.4. Finalització de la sortida de Ca^{2+} del reticle

El CICR és un mecanisme regeneratiu, de manera que ha d'existir algun mecanisme que el finalitzi. Fins a la data, s'han proposat tres mecanismes diferents per explicar-lo. D'una banda, s'ha proposat que aquesta finalització és produïda per un factor estocàstic. Els RyR2 s'agrupen a l'espai diàdic, a cada grup, hi ha un nombre determinat de canals que s'obren i es tanquen de manera estocàstica. Aquest mecanisme proposa que la finalització de CICR és conseqüència d'un tancament simultani del grup de canals RyR2 que produeix la finalització de l'*spark* de Ca^{2+} . D'altra banda, s'ha proposat que la finalització de CICR pot ser conseqüència de la inactivació o adaptació dels RyR2. Aquesta inactivació, produiria la finalització de la sortida de Ca^{2+} del

reticle en cada un dels RyR2 que, finalment, implicaria la finalització de l'*spark* de Ca^{2+} . Finalment, s'ha proposat que la finalització del CICR, és conseqüència de la depleció del contingut de Ca^{2+} de l'interior del reticle. La disminució de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ produiria una menor activació del RyR2 que acabaria amb el CICR. Tot i que hi ha diversos experiments que apunten a aquesta última teoria, el mecanisme implicat encara es manté en controvèrsia^{17,18}.

2.2.5. Store Overload Induced Ca^{2+} Release

La sortida de Ca^{2+} de l'interior del reticle, també es pot donar en absència de despolarització de la membrana plasmàtica per un mecanisme anomenat "*Store Overload Induced Ca^{2+} release*" (SOICR). Aquest mecanisme, es basa en una sortida espontània de Ca^{2+} del reticle provocada per una sobrecàrrega de Ca^{2+} del SR durant la diàstole. El SOICR produeix un *spark* de Ca^{2+} molt similar al que es don durant CICR que permet disminuir la càrrega de Ca^{2+} del reticle, en condicions normals.^{19,20} En condicions anòmales, com en el cas de la CPVT, es produeix un augment de SOICR en els miòcits cardíacs.²¹ L'augment de l'activitat SOICR pot provocar una sincronització dels *sparks* de Ca^{2+} que acabin produint un augment global del $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{C}}$ en període diastòlic. Aquest augment pot activar NCX i generar un corrent de Na^+ entrant que produeixi post-despolaritzacions tardanes (DADs) de la membrana. Si la despolarització és suficient, es poden activar els canals de Na^+

dependents de voltatge de la membrana del miòcit cardíac i generar un PAC en període diastòlic, que pot produir un focus arrítmic.^{19,20} Aquest mecanisme de generació d'arítmies s'explicarà, en més detall, al capítol 5.

En aquests últims apartats, s'han detallat els mecanismes responsables de l'acoblament E-C del miòcit cardíac, en els quals, la homeòstasi del Ca^{2+} intracel·lular és de vital importància. Durant exercici o emoció, l'augment de demanda metabòlica necessita l'increment de la funció cardíaca que es com a conseqüència de l'estimulació dels receptors β -adrenèrgics dels miòcits cardíacs i que està molt relacionat amb la regulació de la homeòstasi del Ca^{2+} intracel·lular. A continuació, es detallarà com l'estimulació dels receptors β -adrenèrgics regula la homeòstasi del Ca^{2+} intracel·lular permetent l'augment de la resposta cardíaca, en circumstàncies d'estrès emocional o físic.

2.3. Estimulació beta adrenèrgica del miòcit cardíac

En períodes d'alta demanda metabòlica, com per exemple durant exercici o emoció, l'estimulació dels receptors β -adrenèrgics dels miòcits cardíacs permet augmentar la força de contracció (inotropia), accelerar la relaxació (lusitropia) i augmentar freqüència de la contracció (cronotropia) del cor. Així doncs, l'estimulació dels receptors β -adrenèrgics augmenta la funció cardíaca per respondre a l'alta demanda metabòlica dels òrgans, en aquestes circumstàncies. En el cor, l'augment de l'activitat simpàtica durant estrès, produeix una descàrrega de catecolamines que estimula els receptors β -adrenèrgics dels miòcits cardíacs. Aquesta estimulació activa la proteïna G unida al receptor β -adrenèrgic, fent que la subunitat α de la proteïna G es dissociï i s'activi l'adenilat ciclase que produeix AMP cíclic (AMPC). L'augment de AMPC produeix l'activació de la proteïna quinasa A (PKA) que fosforila diferents proteïnes que actuen en l'acoblament E-C, com els canals LTCC, els RyR2, fosfolamban i la troponina C. La fosforilació d'aquestes dianes permet la regulació de la homeòstasi del Ca^{2+} intracel·lular, que està involucrada en l'augment de inotropia, lusitropia i cronotropia del cor.⁹ (**Figura 4**)

L'augment de la força de contracció (inotropia) es deu a una major sortida de Ca^{2+} de l'interior SR com a conseqüència de la fosforilació dels canals LTCC i dels RyR2. Aquestes fosforilacions, produeixen un

augment de l'entrada de Ca^{2+} durant el PAC a través dels LTCC i un augment de sensibilitat dels RyR2 pel Ca^{2+} . Tot això, acaba produint un increment en la sortida de Ca^{2+} de l'interior del reticle i com a conseqüència un augment en la força de contracció.¹⁰

L'acceleració de la relaxació (lusitropia) es deu a una major recaptació del Ca^{2+} alliberat durant l'acoblament E-C, gràcies a la fosforilació de fosfolamban i de la troponina C. La fosforilació de fosfolamban, produeix un augment de la recaptació Ca^{2+} cap a l'interior del reticle per part de la bomba SERCA2 que, a la vegada, contribueix a incrementar la sortida de Ca^{2+} de l'interior del reticle i ajuda a augmentar la força de contracció. La fosforilació de la troponina C disminueix la seva sensibilitat pel Ca^{2+} , de manera que el Ca^{2+} es dissocia i es recapta més ràpidament. Cal destacar que, la disminució de la sensibilitat de la troponina pel Ca^{2+} , no provoca una disminució en la força de contracció, ja que, es veu compensada per l'increment de la sortida de Ca^{2+} de l'interior del SR. L'increment de la sortida de Ca^{2+} també produeix un augment de l'activitat de NCX, de manera que, augmenta l'extracció de Ca^{2+} de l'interior cel·lular cap a l'exterior. En conjunt, totes aquestes accions produeixen una davallada més ràpida de la concentració de Ca^{2+} al citosol accelerant la relaxació. I permeten que, en condicions d'estimulació β -adrenèrgica, on la freqüència cardíaca és més elevada, el

reticle s'ompli més ràpid i hi hagi la quantitat suficient de Ca^{2+} perquè es produeixi l'acoblament E-C en el pròxim estímul.¹⁰

L'acceleració de la freqüència cardíaca (cronotropia) està relacionada amb un augment d'activitat de les cèl·lules marcapassos del NSA. Aquestes cèl·lules expressen uns canals de K^+ que s'activen en E_m hiperpolaritzants, responsables d'un corrent entrant anomenat "*funny corrent*" (I_f), que despolaritza la membrana lentament fins que es produeix un PA. Durant l'estimulació dels receptors β -adrenèrgics aquesta despolarització es produeix més ràpidament, en part, perquè en aquestes condicions, es produeix un augment de la sortida espontània de Ca^{2+} del reticle durant la diàstole. L'augment de recaptació Ca^{2+} per part de la bomba SERCA i l'augment de sensibilitat del RyR2 pel Ca^{2+} del reticle en condicions d'estrès, augmenten la sortida espontània de Ca^{2+} del reticle, durant la diàstole, activant NCX. La seva activació produeix un corrent de Na^+ entrant que contribueix a la despolarització de les cèl·lules marcapassos i accelera la generació del PAC augmentant la freqüència cardíaca.

Els efectes de l'activació dels receptors β -adrenèrgics són complexos i involucren moltes proteïnes relacionades amb l'acoblament E-C. Això fa que, en condicions anòmales, com per exemple en condicions de CPVT, l'estimulació dels receptors β -adrenèrgics pugui actuar com a factor desencadenant d'arítmies que poden portar a la MSC. Aquesta tesi està

íntimament relacionada amb la CPVT, de manera que, en el pròxim capítol (3) es descriuran les principals característiques d'aquesta malaltia.

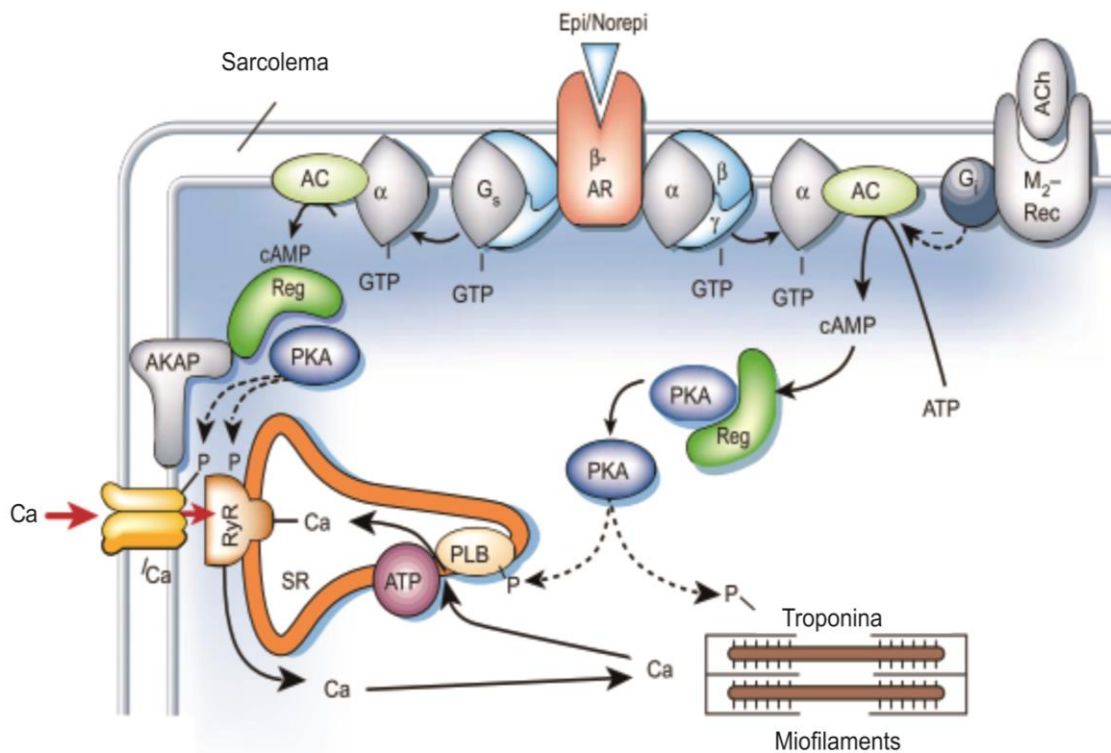


Figura 4. Estimulació dels receptors β -adrenèrgics. Estimulació dels receptors β -adrenèrgics i fosforilació de les dianes de la PKA relacionades amb l'acoblament excitació-contracció del miòcit cardíac. G, proteïna G; AC, adenilat ciclasa; ACh, acetilcolina; AKAP proteïna quinasa d'ancoratge; AR, receptor β adrenèrgic; M2-Rec, receptor muscarínic; PLB, fosfolamban; Reg, subunitat reguladora; PKA, proteïna quinasa A; SR, reticle sarcoplasmàtic. Adaptada de Bers D. *Nature*. (2002).

3. Taquicàrdia ventricular polimòrfica catecolaminèrgica

La CPVT és una canalopatia, que es caracteritza per la presència de taquicàrdies ventriculars polimòrfiques i/o bidireccionals induïdes per catecolamines durant estrès emocional o físic i que pot causar episodis de síncope i MSC en individus molt joves.^{22,23} Va ser descrita per primera vegada al 1978 per Coumel i col. en una sèrie de 4 nens amb síncope produïts per taquicàrdies ventricular induïdes per catecolamines.²⁴ Posteriorment, Leenhard i col. (1995) van fer una caracterització més profunda amb el seguiment, durant 7 anys, de 21 nens que presentaven síncope durant estrès emocional o físic.²⁵ Tot i no realitzar cap estudi genètic, la història familiar de síncope i de MSC en el 30% d'aquests casos, suggeria que la malaltia tenia una base genètica.

Al 1999, Swan i col. van localitzar un locus de CPVT al cromosoma 1q42-q43.²⁶ Posteriorment, al 2001, Priori i col. van relacionar la presència de mutacions al gen que codifica pel RyR2 amb la malaltia, i van determinar que es tractava d'una herència autosòmica dominant.²⁷ Poc després, Lahat i col. (2001) van localitzar una forma autosòmica recessiva de la malaltia al locus 1p13-21 que, posteriorment, van relacionar amb mutacions al gen que codifica per la CASQ2.²⁸

3.1. Característiques clíniques i diagnòstic de la malaltia

El principal símptoma dels pacients amb CPVT són els síncope induïts durant exercici i/o emoció i, en menor mesura, la presència de palpitations i marejos en aquestes condicions. Cal destacar que en un 30% dels casos, la MSC pot ser la primera manifestació clínica de la malaltia.²⁹ Els primers símptomes de la malaltia es comencen a manifestar entre els 7 i 9 anys d'edat encara que també poden aparèixer a la segona dècada de la vida i, fins i tot, més enllà dels 40. El 30% dels casos de CPVT presenten una història familiar amb síncope i/o MSC durant estrès emocional o físic.^{23,25,30} Els pacients amb CPVT es caracteritzen per no tenir anomalies morfològiques o estructural del cor, i per tenir un ECG en repòs completament normal. Tot i que no s'ha acabat de vincular amb la malaltia, alguns estudis mostren la presència de bradicàrdia sinusal en l'ECG d'alguns pacients.^{25,31,32}

Donat que el desencadenant de la malaltia és l'estès emocional o físic, és necessària la realització d'una prova d'esforç o un monitoratge amb Holter per diagnosticar-la. En aquestes proves clíniques es poden observar arítmies ventriculars a freqüències cardíques superiors als 100-120 batecs/minut, que augmenten la seva complexitat durant l'esforç. Comencen amb batecs prematurs que evolucionen a una arítmia ventricular no sostinguda i finalitzen en una arítmia ventricular

sostinguda. Les taquicàrdies ventriculars més característiques són les bidireccionals (TVB) o les polimòrfiques (TVP). En les primeres, existeix una alternança de 180 graus en l'eix del complex QRS de l'ECG, en canvi, en les segones, no existeix una alternança estable d'aquest complex (**Figura 5**).²³ Tot i que no s'observa en tots els pacients, en alguns casos, s'han observat arítmies auriculars durant l'exercici.^{30,33}

Les característiques clíniques de la malaltia fan que la incidència de la CPVT en població general sigui difícil d'avaluar, ja que, l'ECG en repòs i l'ecocardiograma són normals. Tot i que no es desconeix amb exactitud, es calcula que la prevalença no pot ser superior a 1 de cada 10.000 habitants.³³

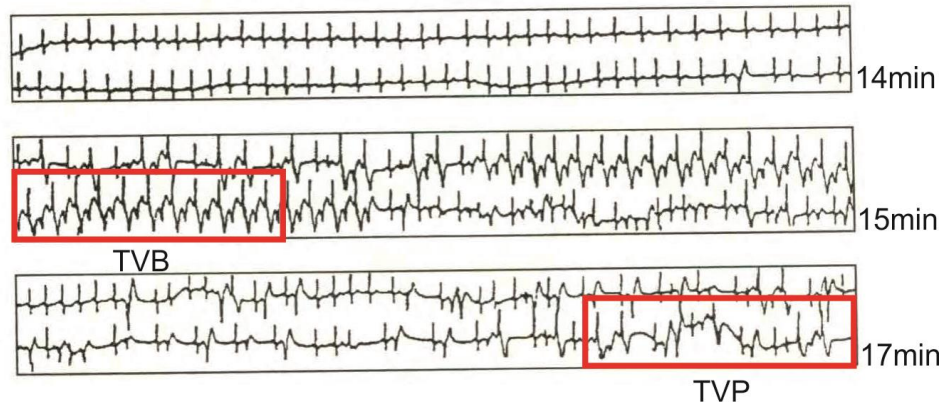


Figura 5. Prova d'esforç d'un pacient amb CPVT. Electrocardiograma d'un pacient amb CPVT durant una prova d'esforç a diferents temps. A l'inici, l'electrocardiograma és normal, a mesura que s'incrementa l'exercici es produeixen taquicàrdies ventriculars bidireccionals (TVB) i taquicàrdies ventriculars polimòrfiques (TVP). Adaptada de Bayés de Luna, Antoni. *Clinical electrocardiography*. 4^aed. Barcelona. 2012

3.2. Genètica de la CPVT

Tal i com s'ha esmentat amb antelació, la CPVT és una malaltia genètica que, principalment, s'associa a mutacions al gen *RyR2* i, en menor mesura, als gens *CASQ2*, *TRDN* i *CALM1*. La genètica de la CPVT serà detallada a continuació.

Entre el 50 i el 60% dels casos de CPVT estan causats per mutacions al gen *RyR2* (CPVT1), que codifica per la proteïna RyR2 de la qual es parlarà amb més detall al capítol 4.^{23,34} El *RyR2* és un dels gens més grans del genoma humà, conté 105 exons i codifica per una proteïna de 4.967 aminoàcids. Actualment, 176 mutacions al *RyR2* s'han relacionat amb CPVT, segons la base de dades "*Human gen mutation data base*" (HGMD).³⁵ De la mateixa manera que en el receptor de rianodina tipus 1 (*RyR1*), relacionat amb hipertèrmia maligna, les mutacions al *RyR2* no es troben distribuïdes uniformement per tot el gen, sinó que s'ubiquen en 4 dominis o "hot spots" que, aproximadament, contenen dos tercers parts de les mutacions descrites en el gen.³⁶ El domini I es situa a la regió N-terminal de la proteïna i compren la regió que va des de l'aminoàcid 77 al 466, el domini II, a la regió central i va des de l'aminoàcid 2246 al 2534, i els dominis III i IV, que es situen a la regió C-terminal, i van des de l'aminoàcid 3778 al 4201 i des del 4497 al 4959, respectivament.²⁰ El significat funcional d'aquests "hot spots" de mutacions no es coneix amb exactitud, però diversos estudis proposen que la interacció entre dominis

de la proteïna és essencial pel correcte funcionament del canal.³⁴ Les conseqüències funcionals de les mutacions al RyR2 es detallaran en el capítol 5.

Les mutacions al gen *CASQ2* s'associen a una forma recessiva de la malaltia i comprenen entre un 3% i un 5% de casos de CPVT (CPVT2). Aquest gen conté 11 exons i codifica per la isoforma 2 de la CASQ, proteïna de 399 aminoàcids de l'interior del SR. Segons la base de dades HGMD, fins al moment, s'han descrit 21 mutacions al gen *CASQ2* associades a CPVT. Així doncs, la prevalença de les mutacions a *CASQ2* és més baixa que la de les mutacions al RyR2, en part, perquè és una forma recessiva de la malaltia.^{29,35}

Tot i que el gens *RyR2* i *CASQ2* són els que s'han associat més vegades a la malaltia, aquests dos gens només expliquen entre el 60% i el 65% dels casos de CPVT. Recentment i gràcies als avenços tecnològics en el camp de la genètica 3 formes noves de CPVT han estat descrites (Taula 1).²⁹

Al 2007, es va identificar un nou locus de CPVT al cromosoma 7 (7p14-p22). Es tracta d'una forma recessiva de la malaltia amb un alt grau de penetrància i que s'ha anomenat CPVT3. Tot i la identificació del locus, no s'ha identificat cap gen ni mutació que es pugui associar a la malaltia.³⁷

Recentment, un estudi realitzat pel grup de Roux-Buisson en una cohort de 97 pacients de CPVT, negatius per mutacions al *RyR2* i *CASQ2*, ha permès la identificació de 3 mutacions al gen *TRDN* que codifica per la triadina, proteïna que forma part del complex multi-proteic CASQ2-junctina-triadina, del que es parlarà més endavant. La segregació de les mutacions suggereix que es tracta d'una forma recessiva de la malaltia, que s'ha anomenat CPVT 4.^{36,38}

Paral·lelament, Nyegaard i col. han associat el locus 14q31-32 a una nova forma dominant de CPVT amb un alt grau de penetrància (CPVT 5).³⁶ La seqüenciació del 70 gens candidats d'aquesta regió, els ha permès trobar la mutació causant de la malaltia al gen *CALM1*, que codifica per la calmodulina (CAM), proteïna que uneix Ca^{2+} i que interacciona amb el *RyR2*.³⁹

Alguns estudis han associat mutacions al gen *KCNJ2*, que codifica pel canal de potassi Kir2.1, i al gen *ANK2*, que codifica per la proteïna Anquirina-2, amb taquicàrdies ventriculars induïdes per catecolamines. Tot i això, l'associació d'aquests gens amb la CPVT està en discussió, ja que, aquests dos gens s'han associat a formes de LQT i es creu que podrien ser fenocòpies de CPVT, més que noves formes de de la malaltia.³³

Taula 1. Gens associats a CPVT

Gen	Proteïna	Locus	Herència	Tipus de CPVT	Nº Mutacions*
RyR2	Receptor de rianodina tipus 2	1q43	Autosòmica dominant	CPVT1	176
CASQ2	Calseqüestrina- 2	1p13.1	Autosòmica recessiva	CPVT2	21
-	-	7p22-p14	Autosòmica recessiva	CPVT3	-
TRDN	Triadina	6q22.31	Autosòmica recessiva	CPVT4	3
CALM1	Calmodulina	14q32.11	Autosòmica dominant	CPVT5	3

*Mutacions associades a CPVT, segons la base de dades HGMD³⁵

3.3. Diagnòstic genètic en CPVT

El diagnòstic genètic és recomanat a tots aquells individus amb sospita de CPVT, ja que, pot ajudar al diagnòstic de la malaltia en el cas índex i també en els seus familiars. Es recomana la realització d'un estudi genètic dels principals gens associat a la malaltia, *RyR2* i *CASQ2*, en individus en que la història clínica o familiar s'associï a CPVT, i en individus que mostrin característiques fenotípiques de malaltia en un test d'esforç o durant un monitoratge amb Holter. En cas de no trobar anomalies genètiques en aquests dos gens, l'estudi genètic es podria estendre a la resta de gens associats a la malaltia. Donat que la CPVT és

una malaltia que sovint no mostra símptomes previs a la MSC, es recomana un estudi genètic en cascada dels familiars, que permetrà la detecció i el seguiment de portadors asimptomàtics de la malaltia en risc de patir un esdeveniment fatal.^{29,33} Actualment, les recomanacions van una mica més enllà i, a més de recomanar un estudi clínic i un seguiment d'aquests portadors asimptomàtics, indiquen la necessitat de tractar-los amb β - bloquejants per evitar nous casos de MSC.^{40,41}

3.4. Tractament de la malaltia

El tractament més utilitzat en la CPVT són els bloquejants dels receptors β -adrenèrgics o β -bloquejants, que antagonitzen l'efecte de les catecolamines responsables de l'inici de l'esdeveniment aritmogènic en CPVT. Els β -bloquejants no curen la malaltia sinó que tenen un efecte preventiu sobre el factor desencadenant de la malaltia. Tot i que l'ús de β -bloquejants és la teràpia més utilitzada en el control d'arítmies en la CPVT, en alguns casos, aquesta teràpia no és del tot efectiva i és necessària la implantació d'un desfibril·lador per evitar la MSC.³³

Recentment, alguns estudis han demostrat l'eficàcia de la flecainida en la reducció d'arítmies ventriculars en pacients de CPVT. Aquest fàrmac, inhibeix el canal responsable de l'entrada de Na^+ durant el PAC i la sortida de Ca^{2+} a través del RyR2. Tot i que els últims estudis demostren la seva eficàcia en el tractament de CPVT, calen estudi més complets

per utilitzar aquest fàrmac de manera rutinària en el tractament de la malaltia.⁴²

La denervació simpàtica esquerra, també s'ha recomanat en el tractament de la malaltia. Aquesta intervenció quirúrgica, disminueix l'estimulació dels receptors β -adrenèrgics durant un estrès emocional o físic, disminuint el risc de patir un esdeveniment aritmogènic. Tot i que s'ha demostrat la seva eficàcia, és una tècnica difícil i invasiva, fet que complica la seva implantació en el tractament de la CPVT.³³

3.5. Estratificació del risc i relació fenotip- genotip en CPVT

Tot i que la CPVT és una de les malalties aritmogèniques amb un risc més elevat de patir MSC, no s'han pogut associar molts factors de risc que predisposin a un esdeveniment fatal. L'estudi realitzat per Hayashi i col. (2009) en una cohort de 101 pacients de CPVT, defineix que els factors que s'associen a un major risc de patir MSC són: tenir una edat compresa entre els 13 i els 26 anys, la presència d'una parada cardíaca anterior al diagnòstic i l'absència de tractament amb β -bloquejants durant el seguiment. Mentre que, els factor que no s'associen a un major risc de patir MSC són: ser cas índex o familiar, haver tingut o no haver tingut síncope i ser portador simptomàtic o asimptomàtic d'una mutació.⁴¹

L'establiment d'una completa correlació genotip fenotip en aquesta malaltia es veu limitada, en part, pel fet que encara no es coneixen tots

els gens causants de CPVT i per la complexitat dels mecanismes implicats en la malaltia. A més, en alguns casos, com el de portadors de mutacions a *CASQ2*, el nombre d'individus afectats és molt baix per determinar aquesta correlació. Tot i això, diversos estudis indiquen que els individus afectats per CPVT amb mutacions al *CASQ2* presenten un fenotip més maligne de la malaltia que els portadors de mutacions al *RyR2*, tot i que, això no implica un major risc de patir MSC.^{26,38,40}

L'existència de mutacions al gen *RyR2* s'ha associat a la presència de símptomes a edats més joves i, en homes, a un major risc de patir síncope.²³ Pel que fa a la correlació fenotip genotip de les diferents localitzacions de les mutacions al *RyR2*, s'ha descrit que les mutacions al domini C-terminal de la proteïna produeixen un fenotip més sever que les mutacions a la resta de dominis. Els individus amb mutacions al C-terminal presenten més taquicàrdies ventriculars no sostingudes que els que tenen mutacions al domini N-terminal o al domini central. D'altra banda, tot i que són necessaris estudis més complets, la presència de mutacions al domini central s'ha associat amb manifestacions supraventriculars de la malaltia.⁴⁰

3.6. Penetrància i expressivitat de la malaltia

Igual que a la majoria de canalopaties, la CPVT es una malaltia que presenta penetrància incompleta i expressivitat variable, és a dir, per una part, la presència del genotip no implica l'expressió del fenotip, i per l'altre, el grau de manifestació del fenotip pot ser diferent entre els diversos individus afectats. En aquest sentit, cal remarcar que tant la penetrància com l'expressivitat de la malaltia depenen, per una banda, del *background* o patrimoni genètic particular de cada individu i, per l'altra, de l'efecte funcional específic de cada mutació.⁴⁵

En un primer moment, els estudis realitzats per Priori i col. (2002) van situar la penetrància de la CPVT, per mutacions a *RyR2*, en un 83%,²³ però estudis més recents mostren que la penetrància de la malaltia és més baixa. Haugaa i col (2010), mostra que el 77% portadors de mutacions al *RyR2*, identificats mitjançant un test genètic en cascada, mostren arítmies ventriculars a la primera prova d'esforç.⁴⁶ Mentre que, l'estudi realitzat per Werf i col. (2012), en 116 portadors de mutacions a *RyR2*, mostra que el 50% dels familiars presenten símptomes de CPVT abans del diagnòstic i que aquest percentatge augmenta al 63% després de la seva avaluació clínica.⁴⁰ D'altra banda, Bauce i col. (2002) mostren un rang de penetrància fenotípica que va des del 25% al 100%, segons la mutació que s'estudia, suggerint que cada mutació té un efecte fenotípic diferent.⁴⁷ Així doncs les diferències descrites en el grau de penetrància

poden ser degudes al *background* genètic de cada individu i als efectes específics de cada mutació. En aquests sentit, les mutacions que causen grans defectes funcionals a la proteïna produirien un fenotip més sever de la malaltia.⁴⁵

D'altra banda, pel que fa a l'expressivitat variable, on el *background* genètic juga un paper molt important, s'ha observat un espectre molt ampli de manifestacions fenotípiques de la CPVT en individus portadors d'una mateixa mutació. Aquest espectre va des de ser portador asimptomàtic fins a tenir MSC a edats molt joves.^{47,48} Tal i com s'ha esmentat amb anterioritat, la localització de les mutacions al domini C-terminal del RyR2 s'ha associat un fenotip més sever de la malaltia, és a dir amb un grau d'expressivitat més elevat de la CPVT.⁴⁰ Tot i això, no s'ha pogut establir una relació entre la localització de les mutacions al RyR2 i el grau de penetrància de la CPVT.

Aquesta tesi es basa en una família afectada per CPVT amb una mutació al *RyR2*. Per tal d'entendre com les mutacions al RyR2 poden produir un fenotip aritmogènic en els pacients de CPVT, els pròxims capítols es centraran en detallar les principals característiques del canal RyR2 (capítol 4), i en descriure com les alteracions funcionals del RyR2 produeixen el fenotip aritmogènic característic de CPVT (capítol 5).

4. El Receptor de Rianodina tipus 2

Els RyR són canals iònics que es troben a la membrana del SR i que regulen la sortida de Ca^{2+} del SR durant l'acoblament E-C, tant en els miòcits de múscul esquelètic, com en els de múscul cardíac. Aquests canals es van observar per primera vegada mitjançant microscòpia electrònica com a regions denses d'electrons que feien de pont entre els túbuls T i el SR dels miòcits del múscul esquelètic.⁴⁹ El nom del canal ve determinat per l'alcaloide rianodina, que és un lligant específic i selectiu del canal que en concentracions baixes (nanomolars) deixa el canal en un estat de subconductància i en concentracions altes el bloqueja. Gràcies a aquest alcaloide, el canal es va poder aïllar i incorporar en bicapes lipídiques artificials, tècnica amb la qual es va descobrir que es tractava d'un canal iònic.^{50,51}

En mamífers, existeixen 3 isoformes de la proteïna (RyR1, RyR2, RyR3), que estan codificades per gens diferents i que comparteixen un alt grau d'homologia: el RyR1 i RyR2 són homòlegs en un 66%, el RyR1 i RyR3 en un 67%, i el RyR2 i RyR3 en un 70%. Cada una de les isoformes és específica de teixit, el RyR1 s'expressa principalment en el múscul esquelètic, el RyR2 en el múscul cardíac i el RyR3 en el cervell.⁵²

A continuació es detallaran les propietats biofísiques, l'estructura, la funció i la regulació del RyR2.

4.1. Propietats biofísiques del RyR2

Les propietats biofísiques del canal RyR2 s'han estudiat mitjançant la incorporació de canals en bicapes lipídiques artificials. El fet que el RyR2 es localitzi a la membrana del SR fa que les tècniques de *patch clamp* convencionals no siguin útils per el seu estudi. El registre de canals únics en bicapes lipídiques artificials permet mesurar l'activitat del canal purificat i reconstruït en una membrana lipídica, que separa dues solucions iòniques. Aquesta aproximació experimental permet una gran flexibilitat en les condicions d'estudi. La tècnica es basa en la formació d'una bicapa lipídica en un petit forat d'un envà de plàstic que separa dues cavitats. La formació de la bicapa és espontània i es genera a partir de lípids resuspesos en un solvent hidrofòbic. El canal purificat s'afegeix a la solució d'un dels costats de la cambra, costat cis (citoplasmàtic), i s'incorpora espontàniament a la bicapa. Generalment, el canal s'incorpora amb la regió citosòlica al costat cis, i la luminal al costat oposat (trans). La incorporació del canal a la bicapa artificial permet la determinació de la conductància iònica unitària o permeabilitat als ions (g) i el registre de la seva activitat o probabilitat d'obertura (P_o).⁵³

El registre del corrent (I) generat a través de la membrana lipídica com a resposta a un voltatge (V), permet calcular la g del canal en unes condicions determinades. Aquest càlcul és possible gràcies a la llei d'Ohm ($I=V/R=V \cdot g$). Així doncs, la conductància unitària del RyR2 és,

aproximadament, d'uns 750pS en condicions simètriques de K^+ (250mM) i d'uns 150pS en condicions simètriques de Ca^{2+} .⁵⁴

Els RyR2 són canals iònics poc selectius pels cations i no són permeables als anions. Tenen una gran conductància pels cations monovalents, com el Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ i Cs^+ , i pels cations divalents com el Ba^{2+} , Sr^{2+} , Ca^{2+} i Mg^{2+} . Tot i que la conductància per als cations monovalents és més alta que per als cations divalents, en condicions fisiològiques, aquests últims es seleccionen a favor dels primers perquè el canal RyR2 té més afinitat per als cations divalents.⁵⁴

Els registres de canals únics es veuen com salts estocàstics entre l'estat obert del canal, estat de màxima conductància, i l'estat tancat del canal, estat de no conductància (**Figura 6**). Existeixen nivells de corrent intermedis que corresponen a estats de subconductància del canal. La fracció de temps en que el canal està obert permet determinar la P_o del canal, mesura directa de la seva activitat. Un augment de la P_o significa que el canal està més temps en estat obert que en estat tancat i/o que la freqüència de l'obertura és més alta, i per tant, que el canal és més actiu. Així doncs la P_o del RyR2 variarà en diferents condicions i dependrà dels diferents mecanismes de regulació del canal. Per exemple, donat que el Ca^{2+} citosòlic regula la funció del canal, augmentant la seva activitat, la P_o del RyR2 augmentarà en concentracions creixents de Ca^{2+} citosòlic.⁵⁵

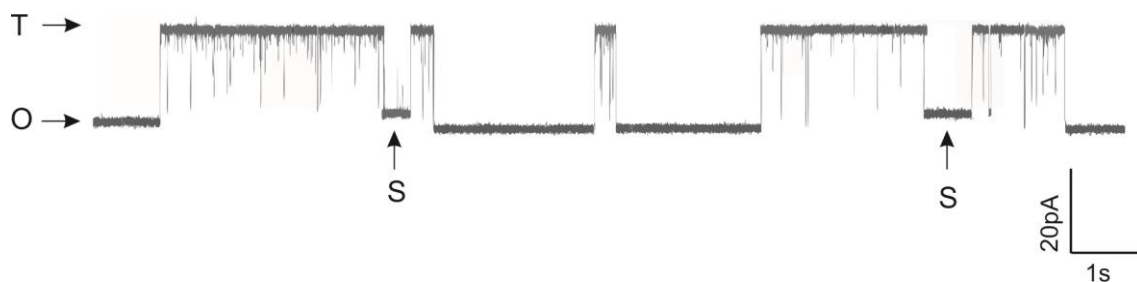


Figura 6. Registre de canal únic de RyR2. Registre d'un canal RyR2 incorporat en una bicapa lipídica artificial. La T indica estat tancat del canal, estat de no conductància, l'O estat obert del canal, estat de màxima conductància, i la S estat de subconductància.

4.2. Estructura del RyR2

Els RyR són canals iònics formats per 4 subunitats o monòmers, que formen una estructura homotetramèrica amb un pes molecular aproximat de 2.3MDa. Cada un dels monòmers fa 565kDA, conté 4.967 aminoàcids i es pot dividir en dues parts principals: la regió N-terminal, que representa el 90% de la proteïna (aproximadament 4.500 aminoàcids) i compren tota la regió citosòlica on interaccionen moltes proteïnes i molècules reguladores del canal; i la regió C-Terminal que representa el 10% de proteïna (aproximadament uns 500 aminoàcids), i que es compon dels dominis transmembrana, la regió intraluminal, i una petita regió citosòlica (**Figura 7A**).^{16,56} La regió C-Terminal és la responsable de la correcta unió entre els 4 monòmers de RyR, permetrà el correcte funcionament del tetràmer i la formació del porus del canal.⁵⁷ El plegament tridimensional d'aquestes dos regions, fa que el canal presenti

una estructura tridimensional en forma de bolet (**Figura 7B**), composta per 2 elements principals: la gran regió citoplasmàtica que ocupa aproximadament el 80% del volum del canal i que mesura 270x270x100Å; i la regió transmembrana que mesura 120x120x60Å⁵⁸. Les dues regions s'uneixen per 4 columnes que formen 4 eixos simètrics al voltant del porus. La regió citoplasmàtica, està formada per diferents regions globulars, entre les que destaquen 3 estructures. Les cantonades de la regió citoplasmàtica o "*clamps*", les estructures connectores o "*handles*" i la regió central o "*rim*" (**Figura 7B**).⁵⁹

La ultraestructura de la regió N-terminal del RyR1 (primers 559 aminoàcids) i del RyR2 (primers 547 aminoàcids) s'ha resolt amb una resolució de 2.5Å i revela que aquesta regió es plega en 3 dominis independents A, B i C (Blau, vermell i verd, respectivament, a la **Figura 7**) que interaccionen predominantment mitjançant una interfase hidrofílica. Aquests 3 dominis formen un vestíbul al voltant dels 4 eixos simètrics que es troben a la regió central del canal o "*rim*". Els dominis A (aminoàcids 1-205) i B (aminoàcids 206-394) tenen una estructura secundària de làmina β, mentre que el domini C (aminoàcids 395-532) està format per un conjunt de 5 hèlix α.⁶⁰ Les mutacions associades a hipertèrmia maligna i a CPVT de la regió N-terminal, majoritàriament es situen a les interfases entre els dominis A, B i C d'una mateixa subunitat o en les interfases entre les diferents subunitats que formen el tetràmer, i

minoritàriament dins dels mateixos dominis. S'ha proposat que les mutacions dins d'un mateix domini causarien un mal plegament d'aquest, mentre que, les mutacions a les interfases, desestabilitzarien la unió entre els diferents dominis desestabilitzant l'estructura del canal.^{60,61}

La resolució de la ultraestructura sencera del canal RyR1, mitjançant criomicroscòpia electrònica (resolució de 4.8Å), ha permès determinar que la regió citosòlica, contigua al domini N-terminal, té una estructura α -solenoides que la uneix amb la regió transmembrana i que es divideix en tres regions, la regió N-terminal solenoide, la regió *bridge* solenoide i la regió del *core* solenoide.⁶²

La ultraestructura del RyR1 mostra que el canal està format per 6 segments transmembrana (S), amb 6 hèlix transmembrana per cada subunitat que envolten el porus central. La regió transmembrana del canal està formada per dos dominis: el domini del por i un pseudodomini sensor de voltatge. El primer, està format per els dominis transmembrana S5 i S6, l'hèlix del por i un segment de pèptid (P) que delimita l'obertura luminal. I el segon, està format pels dominis transmembrana S1-S4. **(Figura 7A)**. L'obertura del costat luminal del canal és comparable a la d'altres canals altament permeables a Ca^{2+} , la grandària de l'obertura fa pensar que només hi pot encabir un ió de Ca^{2+} . L'alta conductància del canal RyR es pot explicar pels residus acídics que componen el segment P i pels residus negatius de l'extensió citosòlica del S6. L'extensió

citòsica del segment S6 acaba amb la regió C-Terminal (CTD) que interacciona amb la regió *core* solenoide. La regió intraluminal del canal està formada per la interfase entre els segments transmembrana S1-S2 i S3-S4 (**Figura 7A**).

La forma global entre les dues conformacions del canal, obert i tancat, no canvia excessivament, una obvia diferència és l'ampliació del porus central després de l'obertura. Les principals diferències entre les dues conformacions s'han observat a la regió citoplasmàtica, en els "*clamps*" i en la regió central "*rim*", on es localitza el "*hot spot*" de mutacions de la regió N-terminal. Els canvis conformacionals en aquestes regions produeixen el moviment de la regió citoplasmàtica cap a fora, que va acompanyat de canvis a la regió transmembrana. Concretament, es produeix una rotació de les hèlix de la regió transmembrana per l'acoblament entre les dues regions a través de les columnes.⁵⁹ La ultraestructura del canal RyR1 indica que el putatiu lloc d'unió del Ca^{2+} al costat citosòlic del canal (EF), es troba pròxim al CTD, de la mateixa subunitat, i a la interfase dels segments S2-S3 de la subunitat adjacent (**Figura 7A**). Aquesta estructura, explica com els canvis de conformació de la regió citosòlica del canal, durant la seva obertura, comporten l'ampliació del porus.

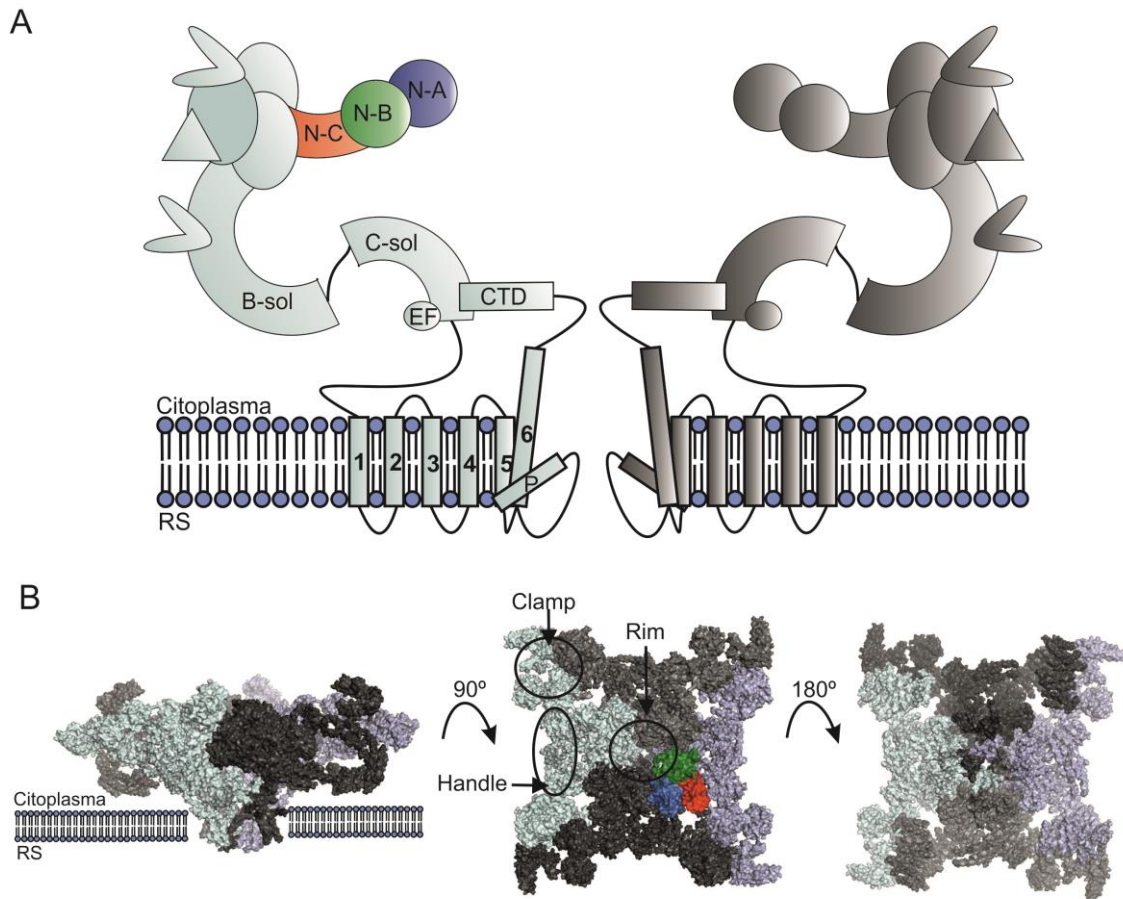


Figura 7. Estructura del RyR1. **A.** Representació esquemàtica de dos monòmers del RyR1 (en diferents grisos). N-A, domini A regió N-terminal (blau); N-B, domini B regió N-terminal; (verd); N-C domini C regió N terminal o N solenoide (vermell); B-sol, *bridge* solenoide; C-sol, *core* solenoide; EF, putatiu lloc d'unió de Ca^{2+} ; CTD, regió C-terminal; P, segment de pèptid; SR, reticle sarcoplasmàtic. **B.** Representació molecular del RyR1, vista de costat (esquerra), vista des del costat citosòlic (centre) i vista des del costat luminal (dreta). En diferents grisos, els monòmers de RyR1. En colors, els diferents dominis de la regió N-terminal, blau, domini A; verd, domini B; vermell, domini C. Figures obtingudes pel programa Pymol a partir de la molècula 3J8E publicada per Zalk i col. *Nature*. (2014)

4.3. Relació estructura - funció del RyR2

La funció del RyR2 durant l'acoblament E-C s'ha definit en el capítol 2 dins del context d'activitat elèctrica i contràctil del cor, així doncs, en aquest apartat, ens centrarem en la relació estructura- funció del canal. La completa comprensió de l'estructura d'una proteïna és essencial pel coneixement del seu funcionament. Tot i que la funció principal del RyR2 és ben coneguda, el coneixement del seu funcionament s'ha vist limitat per la manca de la seva estructura. En aquest sentit, la resolució de l'estructura de la regió N-terminal del RyR2 i el seu conseqüent estudi funcional ha permès aprofundir en el coneixement del funcionament del canal. Liu i col. (2015), han estudiat la funció del domini N-terminal a partir de la deleció dels diferents dominis que la formen (A, B i/o C), cosa que els ha permès identificar el paper de cada un dels dominis en l'activació i finalització de la sortida de Ca^{2+} del reticle. Aquest estudi ha determinat que la regió N-terminal del RyR2 no és essencial per la funcionament del canal, ja que, el canal és funcional tot i la deleció dels diferents dominis de la regió. Tot i això, han determinat que el domini N-terminal juga un paper clau en la modulació de la funció del canal, ja que, la deleció d'aquest dominis produeix que el canal respongui diferent a l'activació i finalització de la sortida de Ca^{2+} del reticle. En concret, la deleció del domini A redueix el llindar perquè finalitzi el SOICR, de manera que, la sortida de Ca^{2+} del reticle tarda més en finalitzar. La

deleció del domini B redueix el llindar d'activació del canal pel Ca^{2+} luminal, augmentant el SOICR i, de la mateixa manera que el domini A, redueix el llindar perquè finalitzi el SOICR. La deleció del domini C, tot i generar un canal funcional, elimina la resposta del canal envers al Ca^{2+} citosòlic i/o luminal i redueix l'expressió del canal. Així doncs, els dominis A i B modulen l'activació (domini B) i finalització (dominis A i B) de la sortida de Ca^{2+} del reticle, mentre que, el domini C juga un paper clau en l'activació del canal, és a dir, en la generació del SOICR i del CICR. En conjunt, la regió N-terminal és determinant en la generació i modulació de l'activació i finalització de la sortida de Ca^{2+} del reticle durant l'acoblament E-C.⁶³

Tot i que aquest estudi ha millorat molt la comprensió del funcionament del canal, la recent resolució de la ultraestructura del RyR1 complet i el conseqüent estudi funcional, ajudaran a aprofundir en el coneixement de la relació entre l'estructura i el funcionament del canal.

4.4. Regulació del RyR2

El RyR2 juga un paper molt important en l'acoblament E-C del miòcit cardíac a cada batec del cor. El seu funcionament coordinat és de vital importància en la contracció cardíaca i, en part, és possible gràcies a diferents moduladors de la funció del canal. La regulació del canal es don gràcies a diferents lligant fisiològics com el Ca^{2+} , el Mg^{2+} i l'ATP, a

proteïnes reguladores que formen un complex molecular amb el RyR2 i a processos cel·lulars que acaben regulant la funció del canal. A part d'aquest reguladors, el RyR2 és pot veure modulats per lligands exògens com la rianodina, la cafeïna i el 4-chloro-m-cresol (CMC), molt útils en l'estudi de les propietats funcionals del canal.

4.4.1. Lligands endògens

El principal activador de la funció del RyR2, durant el batec cardíac, és el Ca^{2+} citosòlic ($[\text{Ca}^{2+}]_C$) responsable de la generació del CICR en el miòcit cardíac. L'activació del RyR2 pel $[\text{Ca}^{2+}]_C$ es donen en concentracions micromolars (1-10 μM), arriba al seu màxim aproximadament als 100 μM i s'inhibeix en concentracions milimolars (1-10mM)⁹. Aquesta resposta bifàsica del canal suggereix la presència de diferents llocs d'unió de Ca^{2+} al costat citosòlic del RyR2: un lloc d'alta afinitat, que activa el canal en baixes concentracions de Ca^{2+} , i un lloc de baixa afinitat, que inhibeix el canal a altes concentracions d'aquest ió.⁶⁴

El Ca^{2+} de l'interior del SR ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$) també juga un paper important en la regulació de la funció del RyR2. L'augment del $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$ augmenta la sortida de Ca^{2+} del SR, i la disminució del $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$ inhibeix la sortida de Ca^{2+} del SR.⁶⁵ La reconstrucció de canals RyR2 en bicapes lipídiques artificials, mostra que el RyR2 són més sensibles a l'activació per Ca^{2+} citosòlic si el contingut de Ca^{2+} de l'interior del SR és elevat, i que l'augment de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$ augmenta la P_o del canal.⁶⁶ Alguns autors havien

proposat que aquest efectes eren causats per l'activació del lloc d'unió del Ca^{2+} citosòlic com a conseqüència de la difusió de Ca^{2+} a través del porus del RyR2, però el fet que aquests efectes siguin independents de la direcció del gradient electroquímic, i que desapareguin amb la digestió del costat luminal de la proteïna, indiquen l'existència d'un lloc d'activació per Ca^{2+} a la banda luminal del canal.⁶⁶⁻⁶⁸ Recentment, Chen i col. (2014) han demostrat que el residu E4872, localitzat a la comporta del canal, és essencial perquè el canal sigui regulat pel Ca^{2+} de dins del SR. La mutació d'aquest residu provoca l'eliminació de la sensibilitat del canal pel Ca^{2+} intraluminal i la desaparició del SOICR, tant en el model cel·lular, com en el model animal. Aquests experiments demostren que la mateixa comporta del canal actua com a sensor de Ca^{2+} de dins del reticle, demostrant l'existència d'un sensor de Ca^{2+} al costat intraluminal del canal.⁶⁹

Així doncs, el RyR2 té com a mínim dos llocs d'unió de Ca^{2+} que produeixen l'activació del RyR2: un al costat citosòlic del canal i un al costat luminal del canal. Aquests dos sensors són independents, però inherentment interactius, ja que, regulen la mateixa comporta d'obertura del canal.

La $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$ afecta la sortida de Ca^{2+} del SR de dues maneres: en primer lloc, reduint l'activitat de RyR2 quan la concentració de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$ és baixa, durant i després CICR (sístole); i en segon lloc, estimulants l'activació del

RyR2, quan la concentració $[Ca^{2+}]_{SR}$ és molt elevada, provocant la sortida de Ca^{2+} del reticle, SOICR (diàstole).

A més del Ca^{2+} , principal regulador endogen de RyR2, existeixen altres lligants com l'ATP i el Mg^{2+} que regulen l'activitat del canal de manera endògena. En presència de Ca^{2+} , l'ATP actua com a agonista del canal augmentant la P_o del RyR2 i fent el canal més sensible al Ca^{2+} .⁶⁴ En canvi el Mg^{2+} , actua inhibint el canal competint amb el Ca^{2+} pel seu lloc d'unió del costat citosòlic. Així doncs, en diàstole, quan la concentració de $[Ca^{2+}]_c$ és baixa, el Mg^{2+} col·labora en la inhibició del canal.⁵²

4.4.2. Lligants exògens

Existeixen molts lligants exògens que poden interaccionar amb els RyRs i regular-ne la seva funció. Entre aquest lligants, n'hi ha que inhibeixen la funció del canal, com la rianodina, i d'altres que l'activen, com el 4-chloro-m-cresol i la cafeïna. Aquest lligants, sovint s'utilitzen com a eines experimentals per aprofundir en el coneixement de la funció del canal o com a mitjans terapèutics en el tractament de malalties relacionades amb els RyRs.

La rianodina, és un alcaloide venenós que inicialment s'utilitzava com insecticida i que té una gran afinitat pels canals RyRs en estat obert. En concentracions nanomolars, la rianodina bloqueja el canal deixant-lo en un estat de subconductància, mentre que, en concentracions micromolars, produeix un bloqueig irreversible del canal.⁷⁰

La cafeïna és una metilxantina que activa els RyR fent que el canal sigui més sensible al Ca^{2+} . Estudis en bicapes lipídiques, demostren que la cafeïna disminueix el llindar d'activació del canal pel Ca^{2+} luminal, però no pel Ca^{2+} citosòlic. Així doncs, produeix la sortida de Ca^{2+} de l'interior del SR augmentant la sensibilitat del RyR pel Ca^{2+} intraluminal⁷¹. El seu efecte sobre el RyR és immediat i és molt utilitzada com a eina experimental per estudiar l'activitat RyR. La cafeïna no és la única metilxantina amb capacitat d'activar el RyR, existeixen metilxantines pro-arrítmiques que mimetitzen la presència de mutacions al RyR2, ja que, augmenten l'activitat del RyR2 incrementant la propensió de sortides espontànies de Ca^{2+} del SR.⁷⁰

El 4-Chloro-m-cresol també és un potent activador dels RyR. Aquest compost activa el canal augmentat la seva probabilitat d'obertura i produeix un augment en la sortida de Ca^{2+} del reticle. El 4-Chloro-m-cresol s'ha utilitzat com a agent de diagnòstic en hipertèrmia maligna, malaltia associada a mutacions al RyR1.⁷⁰

4.4.3. Complex macromolecular del RyR2

Tal i com s'ha esmentat amb anterioritat, la funció del RyR2 també està regulada per proteïnes accessòries que, juntament amb el canal formen un complex proteic macromolecular (**Figura 8**). La majoria d'aquestes proteïnes interaccionen amb la regió citosòlica del canal, que ocupa el 80% del volum de la proteïna. Les principals proteïnes que interaccionen

amb aquesta regió són: la calmodulina (CaM), la FKBP12.6 i les quinases que fosforilen el canal, és a dir, la proteïna quinasa Ca^{2+} /Calmodulina (CAMKII) i la proteïna quinasa A (PKA). Tot i que la regió intraluminal ocupa un volum petit de la proteïna, existeixen tres proteïnes que interaccionen en aquesta regió del canal i en regulen la seva funció: la CASQ2, la junctina i la triadina. A continuació es detallaran les principals proteïnes que formen part del complex macromolecular del RyR2.

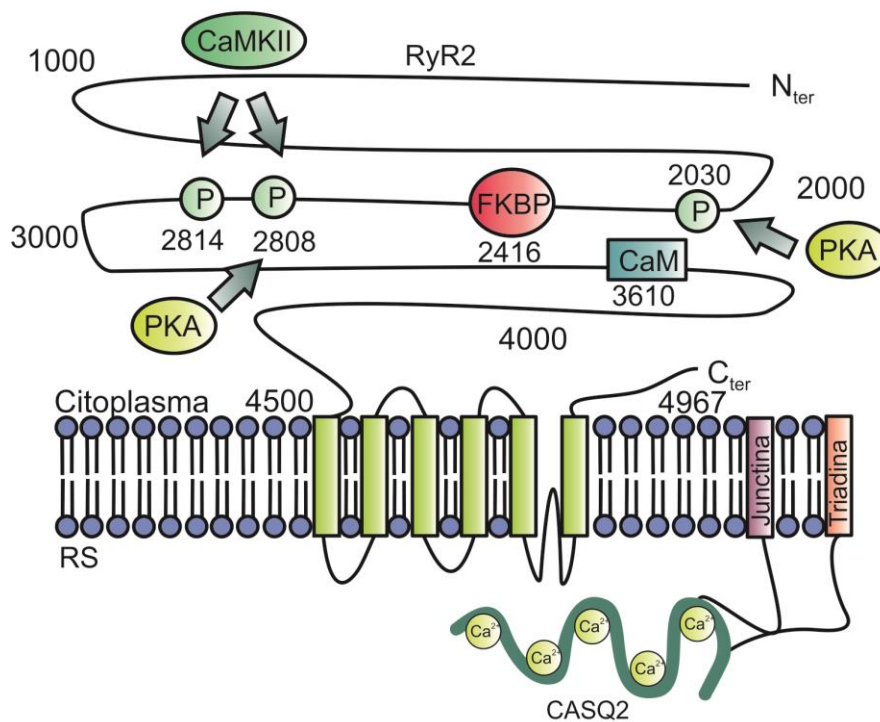


Figura 8. Complex macromolecular del RyR2. Representació esquemàtica del complex macromolecular format pel RyR2 i les proteïnes que el regulen. RyR2, receptor de rianodina tipus 2; CaMKII, proteïna quinasa II; FKBP, proteïna d'unió FKBP12.6; P, fosforilació; PKA proteïna quinasa A; CaM Calmodulina; CASQ2, Calsequestrina; SR reticle sarcoplasmàtic.

4.4.3.1. Calmodulina

La CaM és una proteïna citoplasmàtica que uneix Ca^{2+} i que regula l'activitat del RyR2 unint-se directament al canal. A cada RyR2 s'hi poden unir 4 molècules de CaM, ja que, cada subunitat del tetràmer de RyR2 té un lloc d'unió per aquesta proteïna. Es pot presentar en dues formes, la forma lliure de Ca^{2+} (ApoCaM) i la forma unida a Ca^{2+} (CaCaM). La CaM inhibeix el RyR2 a totes les concentracions de $[\text{Ca}^{2+}]_c$, així doncs, tant ApoCaM com CaCaM inhibeixen el canal disminuint la seva P_o , segurament, com a conseqüència d'una disminució de la sensibilitat del canal pel $[\text{Ca}^{2+}]_c$.^{72,73}

La principal funció de la CaM, envers el RyR2, és la inhibició del canal evitant la sortida de Ca^{2+} de l'interior del reticle en situació de repòs, (diàstole). Xu i col. (2010) han demostrat que una mutació al RyR2 associada a CPVT, causa una unió deficient entre els dominis del canal que produeix una disminució de la unió entre CaM i RyR2. Aquesta disminució produeix un augment en la sortida espontània de Ca^{2+} del reticle que produeix un fenotip aritmogènic en el ratolí.⁷⁴ D'altra banda, i com ja s'ha descrit amb antelació, mutacions al gen *CALM1* s'han associat a CPVT. L'estudi funcional d'aquestes mutacions demostra que la presència de la CaM mutada produeix un augment en la P_o del RyR2 que augmenta la sortida espontània de Ca^{2+} del reticle i que pot arribar a produir un fenotip aritmogènic.⁷⁵

4.4.3.2. FKBP12.6

La proteïna d'unió FKBP12.6 és una proteïna accessòria que interacciona amb la regió citosòlica del RyR2, amb una estequiometria de 4 FKBP12.6s per homotetràmer de RyR2. S'ha proposat que la unió de FKBP12.6 a RyR2 estabilitza l'estat tancat del canal, ja que, l'eliminació del FKBP12.6 comporta un augment en la P_o del canal RyR2 i un augment del temps en que el canal està obert. Aquest augment d'activitat comporta un augment de la sortida espontània de Ca^{2+} del reticle, que es restableix amb la presència de FKBP12.6. Segons aquests experiments, la proteïna d'unió FKBP12.6 inhibiria l'activitat del RyR2 regulant la sortida de Ca^{2+} del reticle.⁷⁶ No obstant això, resultats obtinguts pel grup de Xiao i col. (2009) amb un model de ratolí deficient de FKBP12.6, mostren que l'absència d'aquesta proteïna no produeix un efecte en la funció del RyR2⁷⁷. A més, estudis realitzats per altres grups, mostren que l'absència o presència de FKBP12.6 no altera l'obertura del canal RyR2 i posen en dubte la regulació del RyR2 per la FKBP12.6.⁷⁶

D'altra banda, s'ha proposat que l'associació del FKBP12.6 amb el RyR2 depèn de la fosforilació del canal per part de la PKA. La fosforilació del RyR2 produiria un augment de la dissociació de la proteïna FKBP12.6 que, segons alguns autors, comporta la desestabilització de l'estat tancat del canal.⁷⁸ En aquest sentit, el grup de Marx i col. han proposat que les mutacions al RyR2 disminueixen l'afinitat de la proteïna FKBP12.6 pel

canal. Durant l'estimulació β - adrenèrgica i en presència de mutacions al RyR2, la disminució d'aquesta afinitat produiria un augment de la dissociació de FKBP12.6 que desestabilitza l'estat tancat del RyR2, augmentant la sortida espontània de Ca^{2+} del reticle.^{79,80} Tot i això, alguns experiments evidencien que la PKA no està involucrada en la dissociació de la FKBP12.6 i el RyR2, posant en dubte el que proposen el grup de Marx i col.^{81,82}

Així doncs, la regulació de l'activitat del canal RyR2 per part de la proteïna FKBP12.6 encara es manté en discussió.

4.4.3.3. Proteïnes que fosforilen el RyR2: CaMKII i PKA

La fosforilació del RyR2 juga un paper important en la regulació del canal. El RyR2 pot ser fosforilat principalment per dues quinases: per la CaMKII, modulada pels nivells de Ca^{2+} intracel·lular; i per la PKA, l'activitat de la qual depèn dels nivells cel·lulars d'AMPc.

Fins a la data, s'han identificat 3 residus al RyR2 que poden ser fosforilats, són les serines que es localitzen als aminoàcids 2030 (S2030), 2808 (S2808) i 2814 (S2814). En l'actualitat, es coneix que el residu S2808 pot ser fosforilat per CaMKII i per PKA, mentre que, el residu S2814 i el S2030 són únicament fosforilats per CaMKII o per PKA, respectivament.⁸³ A continuació, es detallarà el paper d'aquestes dues quinases en la fosforilació del RyR2.

La **CaMKII** és una quinasa que s'expressa en el teixit cardíac i que s'activa com a resposta a un increment en la $[Ca^{2+}]_c$. Aquesta quinasa fosforila un gran nombre de proteïnes involucrades en la homeòstasi del Ca^{2+} intracel·lular durant l'acoblament E-C, entre elles el RyR2, i desenvolupa un paper important en la modulació d'aquest procés a cada batec cardíac. Quan, durant la sístole, augmenta la $[Ca^{2+}]_c$ la CaCaM s'uneix al domini regulador de CaMKII produint la seva activació i la seva autofosforilació, que manté la CaMKII activa tot i que baixin els nivells de Ca^{2+} citosòlic.⁸⁴ L'activació de la CaMKII produeix la fosforilació el residu S2814 del RyR2. Aquesta fosforilació augmenta la P_o del canal augmentant la seva activitat durant la sístole. Experiments realitzats en miòcits cardíacs aïllats, mostren que la sobreexpressió de CaMKII augmenta la fracció de Ca^{2+} que surt del reticle durant el CICR i redueix el contingut de Ca^{2+} de l'interior del reticle. A més, s'ha observat que la sobreexpressió d'aquesta quinasa augmenta la freqüència de sortides espontànies de Ca^{2+} del reticle durant la diàstole.⁸⁵ Així doncs, la fosforilació del RyR2 per CaMKII potencia l'activitat del canal durant la sístole, augmentant la fracció de Ca^{2+} que surt del reticle en el CICR, i durant la diàstole, descarregant el SR de Ca^{2+} quan és necessari.

La **PKA** és la quinasa que s'activa durant l'estimulació simpàtica del cor a través de l'estimulació dels receptors β -adrenèrgics. Aquesta estimulació, acaba produint un augment en el AMPc que activa la PKA i que fosforila

diferents proteïnes relacionades amb l'acoblament E-C, entre ells el RyR2 (**Figura 4**). Així doncs, la PKA desenvolupa un paper important en la regulació de l'acoblament E-C del miòcit cardíac en resposta a l'estímul β -adrenèrgic. Experiments realitzats en bicapes lipídiques artificials mostren que la fosforilació del RyR2 per PKA augmenta l'activitat del canal, augmentant la P_o en resposta a Ca^{2+} i incrementant el nombre d'estats de subconductància del canal.⁷² Tot i que es coneix que la PKA és capaç de fosforilar dos residus del RyR2, el S2808 i el S2030, existeix molta controvèrsia sobre quina de les dos fosforilacions causa aquest efecte funcional al RyR2.

Marks i col. han proposat que l'augment d'activitat del canal RyR2, durant la resposta β -adrenèrgica, és conseqüència de la dissociació de la proteïna FKBP12.6 provocada per la fosforilació de la serina 2808 del RyR2 per la PKA.⁷⁹ Però, tal i com s'ha esmentat amb anterioritat, aquesta teoria està molt discutida, ja que, existeixen indicis de que la PKA no està involucrada en la dissociació de la FKBP12.6 i el RyR2, i que aquesta dissociació no produeix cap efecte funcional en el RyR2.^{77,81}

Per tal d'esbrinar el paper de la fosforilació de la S2808 en l'activitat del RyR2, s'ha generat el model de ratolí mutant S2808A, modificant la serina de la posició 2808 per una alanina, que evita que el residu es fosforili. Tot i que alguns grups indiquen que no hi ha diferències significatives en la resposta al estímul β -adrenèrgic del ratolí mutant i del

salvatge,⁸⁷ altres grups mostren que el ratolí mutant S2808A presenta una resposta cardíaca alterada davant de l'exercici.⁸⁸ La reconstrucció d'aquest canal en bicapes lipídiques artificials mostra que el canal RyR2-S2808A disminueix la sensibilitat del canal pel Ca^{2+} de l'interior del SR, suggerint que la fosforilació del residu S2808 augmenta la sensibilitat del canal pel Ca^{2+} intraluminal.⁸⁹ En aquest sentit, recentment, s'ha demostrat que el ratolí RyR2-S2808D, que imita una fosforilació constitutiva d'aquest residu del RyR2, presenta un augment de la sortida espontània de Ca^{2+} del SR durant la diàstole i una reducció en el contingut de Ca^{2+} del SR. Aquests fet suggereix que la fosforilació del residu S2808 augmenta la sensibilitat del RyR2 pel Ca^{2+} de l'interior del reticle.⁹⁰

Tot i aquests resultats, altres grups proposen que l'augment de sensibilitat del RyR2 pel Ca^{2+} intraluminal durant l'estimulació dels receptors β -adrenèrgics, no és conseqüència de la fosforilació del residu S2808, sinó del residu S2030. Alguns estudis indiquen que la mutació S2030A, que evita que el residu S2030 sigui fosforilat, produeix una disminució de l'activitat de RyR2 en presència de PKA, i que la mutació S2030D, que imita una fosforilació constitutiva d'aquest residu, potencia la resposta del RyR2 envers al Ca^{2+} intraluminal, augmentant el SOICR en les cèl·lules que expressen el canal mutat.⁹¹

En conjunt, els resultats obtinguts pels diferents grups indiquen que la fosforilació del RyR2 per PKA produeix un augment de sensibilitat del canal al Ca^{2+} intraluminal, però no aclareixen quin dels dos residus fosforilats causa l'efecte funcional observat al RyR2 per l'acció de la PKA.

4.4.3.4. Calseqüestrina, Junctina i Triadina

La CASQ2, la junctina i la triadina són proteïnes de l'interior del SR que interaccionen amb el RyR2 formant un complex proteic a la banda intraluminal del canal.

La CASQ2 és una proteïna que té una alta afinitat pel Ca^{2+} i que actua com a tampó d'aquest ió a l'interior del SR. En presència de Ca^{2+} , la CASQ2 forma agregats proteics molt organitzats, que poden anar des de dímers, en baixes $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$, fins a polímers, en altes de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$. La proximitat de la CASQ2 al RyR2, assegura l'existència de grans quantitats de Ca^{2+} a prop del porus del canal, preparats per la sortida de Ca^{2+} del interior del SR, durant l'acoblament E-C.^{16,52}

La CASQ2 pot interaccionar amb el RyR2 directament o a través de la triadina i la junctina formant un complex proteic. Quan la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$ és baixa, la CASQ2 interacciona amb el complex, però quan aquesta és alta, la unió del Ca^{2+} a la proteïna li produeix un canvi conformacional que provoca la seva dissociació del complex. Alguns estudis han suggerit que en $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$ elevades, l'activació del RyR2 és deguda a la dissociació de la CASQ2 del complex proteic, proposant a aquesta proteïna com els

sensor de Ca^{2+} luminal del RyR2.⁷⁰ Tot i això, aquesta teoria està molt discutida, ja que, els estudis en el ratolí *knockout* pel gen CASQ2 (absència de la proteïna) mostren que RyR2 no perd la sensibilitat pel Ca^{2+} intraluminal.⁷¹ A més, actualment, es coneix que el sensor de Ca^{2+} intraluminal del SR és intrínsec del RyR2.⁶⁹ L'absència o reducció de CASQ2 a dins del reticle, ja sigui per mutacions al seu gen o en models animals *knockout* per CASQ2, disminueix la capacitat del reticle de tamponar Ca^{2+} i accelera la recuperació del reticle perquè es torni a donar la sortida de Ca^{2+} a través dels RyR2. En conjunt, produeixen un augment de SOICR que pot acabar provocant un fenotip aritmogènic.^{20,94}

La junctina i la triadina són dues proteïnes transmembrana del SR, que interaccionen entre elles, amb el RyR2 i amb la CASQ2. La funció d'aquestes dues proteïnes en els miòcits cardíacs no es coneix exactament, però s'han proposat dues funcions per cada una d'elles. Per una banda, s'ha proposat que actuen com a proteïnes d'ancoratge que mantenen la CASQ2 a prop de la membrana del reticle, i per l'altra, s'ha suggerit que actuen com a proteïnes reguladores del RyR2, ja que, la seva sobreexpressió augmenta l'activitat del RyR2.⁶⁵ Tot i que no es coneix exactament quina funció desenvolupen, aquestes dues proteïnes juguen un paper important en la correcta funció cardíaca, la seva absència produeix un fenotip aritmogènic en models animals i, en el cas de la triadina, en pacients de CPVT.³⁸

5. Alteracions funcionals del RyR2 i aritmogènesi

Tal i com s'ha comentat en el capítol 3 la CPVT és una malaltia associada a arítmies i MSC que majoritàriament s'associa a mutacions al gen que codifica pel RyR2, del qual se n'ha parlat al capítol 4. En el present capítol, es detallaran com les alteracions funcionals del RyR2 produeixen el fenotip aritmogènic característic de CPVT .

5.1. Mutacions al RyR2

En l'actualitat, un total de 220 mutacions han estat descrites al RyR2, la majoria associades a CPVT. La presència de mutacions al RyR2 també s'ha associat a una forma atípica de displàsia aritmogènica del ventricle dret (DAVD), però cap dels models animals amb mutacions al RyR2 mostren anomalies estructurals al cor, ni cap fenotip característic de la DAVD. El fet que els models animals no mostrin fenotip per DAVD i que cap altre grup hagi pogut establir aquesta associació, fa que actualment aquesta associació estigui en discussió.²¹

Tal i com s'ha descrit amb anterioritat, les mutacions al RyR2 no estan uniformement distribuïdes per tota la proteïna, com passa en altres canals iònics, sinó que es concentren en uns determinats dominis o "hot spots". De la mateixa manera que no es distribueixen uniformement per tot el gen, tampoc es distribueixen uniformement entre els 4 dominis. El domini C-terminal de la proteïna, que compren domini III i el IV, acumula

el 46% de mutacions, el domini central o domini II el 21%, i el domini N-terminal o domini I el 18%. Només un 15% de les mutacions es troben fora d'aquests dominis.²⁰

El 95% de mutacions identificades al RyR2 són mutacions puntuals, és a dir, canvis d'un sol nucleòtid que provoquen un canvi d'aminoàcid. Tot i que les delecions i/o insercions no són comunes en el *RyR2*, un 2% de les mutacions descrites són petites delecions i/o insercions que no produeixen un canvi en el patró de lectura (*frameshift*), i un altre 2% delecions grans en les que es perd l'exó 3. Fins a la data, no s'ha identificat cap mutació que produeixi un codó STOP prematur, ni cap mutació que produeixi un canvi en el patró de lectura en el *RyR2*. Així doncs, la CPVT es diferencia d'altres canalopaties, on la presència de proteïnes truncades (amb codons STOP prematurs), delecions i insercions són més comunes.^{20,35}

5.2. Conseqüències funcionals de les mutacions al RyR2

S'han proposat diferents mecanismes pels quals les mutacions al RyR2 alteren les propietats fisiològiques del canal en CPVT. La distribució de les mutacions al RyR2 indica que és poc probable que totes produeixin un fenotip aritmogènic per un mateix mecanisme. Malauradament, un percentatge molt baix de mutacions al RyR2 són estudiades funcionalment, fet que dificulta la determinació d'aquests mecanismes.

Els estudis funcionals realitzats fins al moment enfoquen cap a dues direccions. Per una banda, s'ha observat que algunes mutacions del RyR2 afecten la sensibilitat del canal pel Ca^{2+} luminal, mentre que per l'altre, algunes mutacions afecten la sensibilitat del canal pel Ca^{2+} citosòlic.

5.2.1. Alteració de la sensibilitat pel Ca^{2+}

Donada la importància del Ca^{2+} luminal en la generació de l'activitat SOICR i la generació de DADs durant la diàstole, s'ha plantejat que les mutacions al RyR2, alteren la sensibilitat del canal pel Ca^{2+} luminal i augmenten l'activitat SOICR.²⁰ Chen i els seus col·laboradors han demostrat que la majoria de mutacions, estudiades fins al moment, augmenten la sensibilitat del canal pel Ca^{2+} intraluminal i disminueixen el llindar de Ca^{2+} necessari perquè es produeixi una sortida espontània de Ca^{2+} del reticle. Així doncs, aquestes mutacions produeixen un augment de l'activitat SOICR i, com a conseqüència, una disminució dels nivells de Ca^{2+} de l'interior SR.⁹⁵⁻⁹⁸ Els miòcits aïllats dels ratolins *knock-in* (portadors d'una mutació al RyR2) corroboren aquests resultats, ja que, en condicions diastòliques presenten un augment de l'activitat SOICR, DADs i arítmies.²¹ Tot i que la majoria de mutacions que afecten la sensibilitat del canal pel Ca^{2+} intraluminal produeixen un guany de funció de la proteïna, Jiang i col. (2007) han descrit una mutació, localitzada a la regió C-terminal del canal (A4860G), que produeix una pèrdua de funció

de la proteïna. Aquesta mutació disminueix la sensibilitat del RyR2 pel Ca^{2+} intraluminal i que elimina completament l'activitat SOICR.⁹⁹ El model animal *knock-in* per aquesta mutació, mostra que la disminució de la funció del RyR2 pot provocar arítmies com a conseqüència de la generació de post-despolaritzacions tempranes (EADs, de l'anglès *Early Afterdepolarizations*), despolaritzacions que es produeixen abans de que el PAC previ hagi finalitzat.¹⁰⁰

Tot i que la majoria de mutacions al RyR2, associades a CPVT, produeixen un canvi en la sensibilitat del canal pel Ca^{2+} luminal, diverses mutacions estudiades del domini N-terminal i del domini central mostren una alteració en la sensibilitat del canal pel Ca^{2+} citosòlic.²⁰ Marks i col·laboradors proposen que aquestes mutacions augmenten la sensibilitat del canal pel Ca^{2+} citosòlic i produeixen una activació inapropiada del canal en concentracions baixes de Ca^{2+} . Això provoca la sortida de Ca^{2+} del reticle durant la diàstole que produeix DADs i arítmies.¹⁰¹

5.2.2. Mecanismes moleculars de la disfunció del RyR2

Existeixen evidències robustes de que les mutacions afecten la sensibilitat del RyR2 pel Ca^{2+} luminal i/o pel Ca^{2+} citosòlic, però no està clar quins mecanismes produeixen aquests efectes. S'han proposat dos mecanismes per explicar-ho. Per una banda, s'ha proposat que les mutacions del RyR2 produeixen una disrupció en les interaccions intra-

moleculars del canal (*Domain Unzipping*); i per l'altra, s'ha proposat que les mutacions al RyR2 desestabilitzen la unió entre FKBP12.6 i RyR2. Ambdós mecanismes desestabilitzen l'estat tancat del canal produint un canal més sensible al estímul, ja sigui al Ca^{2+} luminal o al Ca^{2+} citosòlic.

5.2.2.1. Domain Unzipping

S'ha proposat que dues regions citoplasmàtiques del RyR2 participen en la interacció entre dominis del canal i estableixen el seu estat tancat. En condicions de repòs, la regió N-terminal (residus 1 – 600) interaccionaria amb el domini central (residus 2000-2500) en un procés que en anglès s'anomena “*zipping*”. Ikemoto i col. (2000) proposen que l'estimulació del canal debilita la unió entre aquests dominis (*unzipping*) i com a conseqüència es produeix l'obertura del canal i la sortida de Ca^{2+} de l'interior del reticle.¹⁰² La recent resolució de l'estructura del RyR1 dona suport aquesta teoria, ja que, l'estructura tridimensional del canal mostra una proximitat entre els dominis.⁶²

El domini N-terminal i el domini central són regions del RyR2 on s'han identificat un gran nombre de mutacions associades a CPVT. S'ha proposat que les mutacions al RyR2 debiliten la unió entre aquests dominis desestabilitzant l'estat tancat del canal i fent-lo més sensible a l'estímul. Els resultats obtinguts per Suetomi i col. (2011) donen suport a aquesta hipòtesi. Els seus experiments suggereixen que la presència de la mutació S2246L al domini central, produeix una deficiència en la

interacció entre aquest domini i el domini N-terminal. Aquest fet, comporta una activació anòmala del canal en condicions diastòliques, que es veu reflectida en un increment de freqüència de les sortides espontànies de Ca^{2+} del SR.¹⁰³

Tot i les evidències que donen suport aquesta teoria, es qüestiona com les mutacions fora del domini N-terminal i el domini central poden debilitar aquesta unió i desestabilitzar l'estat tancat del canal. En aquest sentit, l'obertura del canal implica importants canvis conformacionals en la seva estructura, de manera que, és raonable pensar que mutacions localitzades al llarg de tota la molècula, puguin alterar aquests canvis conformacionals i produint una disfunció del canal.²⁰

5.2.2.2. Desestabilització de la unió entre FKBP12.6 i RyR2

Tal i com s'ha esmentat en apartats anteriors, s'ha proposat que la proteïna FKBP12.6 s'uneix al RyR2 estabilitzant l'estat tancat del canal. Quan el RyR2 es fosforila la proteïna FKBP12.6 es dissocia del canal i la seva P_o augmenta. Així doncs, Marks i col. han proposat que les mutacions al RyR2 produeixen una desestabilització de la unió entre FKBP12.6 i RyR2 que, en condicions d'estimulació β -adrenèrgica, desestabilitzen l'estat tancat del canal i produeixen un augment en la sortida de Ca^{2+} del reticle. En aquest sentit, aquests autors han demostrat que diverses mutacions al RyR2 disminueixen la interacció

entre FKBP12.6 i el canal, i que la seva interacció es veu encara més reduïda després de la fosforilació del canal per PKA.^{78,79} Tot i això, altres grups no han corroborat aquest resultat. Per una banda, diversos estudis han demostrat que la majoria de mutacions al RyR2 no comprometen la unió entre FKBP12.6 i el RyR2, ni en sistemes d'expressió heteròloga, ni en models animal *knock-in*.^{95,96,104,105} I per l'altra, s'ha demostrat que el compost K201, que augmenta la unió entre FKBP12.6 i RyR2, no protegeix al ratolí de les arítmies, suggerint que la disfunció del canal no està causada per la desestabilització de la unió entre FKBP12.6 i RyR2.¹⁰⁵ Aquests resultats, juntament amb els obtinguts per Bers i col., que qüestionen que la fosforilació del RyR2 per PKA produeixi la dissociació de la FKBP12.6, fan que aquesta hipòtesi estigui molt discutida.⁸¹

Tot i que existeix controvèrsia de quins són els mecanismes moleculars de la disfunció del RyR2 com a conseqüència de mutacions al gen que el codifica, és ben conegut que la desregulació de la homeòstasi de Ca^{2+} intracel·lular pot provocar arítmies i CPVT. Així doncs, els mecanismes de generació d'arítmies en CPVT s'explicaran a continuació.

5.3. Mecanismes de generació d'arítmies en CPVT

El principal mecanisme de generació d'arítmies en CPVT, conegut fins al moment, és la generació de DADs que produeixen activitat

desencadenada (*triggered activity*). En un primer moment, aquesta hipòtesi es va basar en que les TVBs del pacients de CPVT eren molt similars a les arítmies induïdes amb fàrmacs digitàlics (fàrmacs que augmenten la inotropia). Es coneix que aquest fàrmacs produeixen una acumulació de Ca^{2+} al citoplasma que activa NCX, de manera que es genera un corrent de Na^+ entrant que pot produir DADs i activitat desencadenada que produeixi arítmies.²¹

Tal i com s'ha esmentat amb antelació, la majoria de mutacions al RyR2 produeixen un guany de funció al canal. Durant l'estimulació del receptors β -adrenèrgics, l'acció de la PKA produeix un augment de l'entrada de Ca^{2+} a través dels canals LTCC de la membrana plasmàtica i un augment de la recaptació de Ca^{2+} a l'interior del reticle provocant una sobrecarrega de Ca^{2+} intraluminal, que en condicions normals, augmenta la contracció de miòcit o inotropia. En condicions de CPVT, l'augment de sensibilitat del RyR2 i aquesta sobrecàrrega de Ca^{2+} , produeixen un augment de les sortides espontànies de Ca^{2+} del reticle durant la diàstole que activa l'intercanviador NCX generant un corrent de Na^+ entrant. Aquest corrent, pot acabar despolaritzant la membrana, produint DADs i activitat desencadenada que produeixi un focus arítmic.²⁰ En aquest sentit, la majoria de models animals per CPVT, amb mutacions al RyR2, demostren un augment de sortides de Ca^{2+} durant la diàstole i donen suport aquest mecanisme **(Figura 9)**.

El primer model animal de CPVT amb mutació al RyR2 que es va desenvolupar, va ser el ratolí *knock-in* portador de la mutació R4496C del RyR2. De la mateixa manera que els pacients de CPVT, aquest animal desenvolupa TVBs i TVPs durant l'estimulació β -adrenèrgica. En aquestes mateixes condicions, els miòcits aïllats d'aquest ratolí presenten sortides espontànies de Ca^{2+} que produeixen DADs. Aquests resultats demostren que la generació de les taquicàrdies ventriculars són conseqüència de DADs produïdes per un augment de la sortida espontània de Ca^{2+} del reticle. Aquestes observacions, es confirmen en altres models animals per CPVT, com el ratolí *knock-in* R176Q, que mostra taquicàrdies ventriculars durant exercici, i el ratolí *knock-in* R2474S, que també presenta MSC durant l'exercici.^{21,106}

Tot i que l'augment de sortida espontània de Ca^{2+} durant la diàstole, és el mecanisme cel·lular més acceptat en la producció d'arítmies en CPVT, no explica com mutacions al RyR2, que provoquen una disminució de la funció del canal (RyR2 A4860G), acaben produint taquicàrdies ventriculars i CPVT. El model de ratolí *knock-in* amb la mutació A4860G mostra alteracions típiques de CPVT a l'ECG (ex.TVBs) en condicions d'estimulació adrenèrgica. A més, els miòcits d'aquest ratolí mostren una prolongació del PAC i ràfegues d'oscil·lacions de Ca^{2+} anòmales (dues d'oscil·lacions de Ca^{2+} seguides) que prolonguen la sortida de Ca^{2+} del reticle, en sístole i acaben produint EADs i arítmies. Així doncs, la

mutació A4860G revela un nou mecanisme d'aritmogènesi en CPVT. La pèrdua de funció del canal RyR2, produeix una sobrecàrrega de Ca^{2+} del reticle que resulta en una ràfega d'oscil·lacions de Ca^{2+} anòmales, que prolonguen la sortida de Ca^{2+} del reticle. Aquesta prolongació produeix una activació de NCX durant la fase plató i la fase de repolarització del PAC que provoca EADs. Al igual que el mecanisme convencional de generació d'arítmies en CPVT, aquest nou mecanisme, basat en una pèrdua de funció del canal RyR2, pot acabar produint arítmies potencialment mortals **(Figura 9)**.^{100,107}

Així doncs, en l'actualitat, es coneixen almenys dos mecanismes pels quals mutacions al RyR2 poden provocar arítmies. Un és el guany de funció del canal, produït per un augment de sensibilitat al Ca^{2+} intraluminal i/o al Ca^{2+} citosòlic, que augmenta la sortida Ca^{2+} durant la diàstole i pot provocar DADs; i l'altre, una disminució de la funció del RyR2 produïda per mutacions, com l'A4860G, que alteren les oscil·lacions de Ca^{2+} durant la sístole i que poden provocar EADs. Ambdós mecanismes poden provocar arítmies com a conseqüència de la presència, sincronitzada, de DADs o EADs en un grup nombrós de miòcits contigus que provoquin activitat desencadenada. A més, l'alteració de la homeòstasi de Ca^{2+} intracel·lular pot produir un substrat vulnerable a la reentrada de l'excitació. D'una banda la desregulació de la homeòstasi del Ca^{2+} intracel·lular pot produir DADs que no arriben al

llindar per produir un PAC però que poden despolaritzar la membrana suficientment per inactivat els canals de Na^{2+} promovent una dispersió de l'excitabilitat; i per l'altre, l'alteració dels cicles de Ca^{2+} pot produir una descompensació de la duració del PAC entre diferents zones promovent la dispersió de la refractarietat. Ambdós mecanismes generen un substrat que, juntament amb la generació de DADs o EADs en zones contigües, poden produir una reentrada de l'excitació, a destemps de l'impuls elèctric generat al nòdul NSA, i una arítmia fatal que condueixi a la MSC.¹⁰⁸

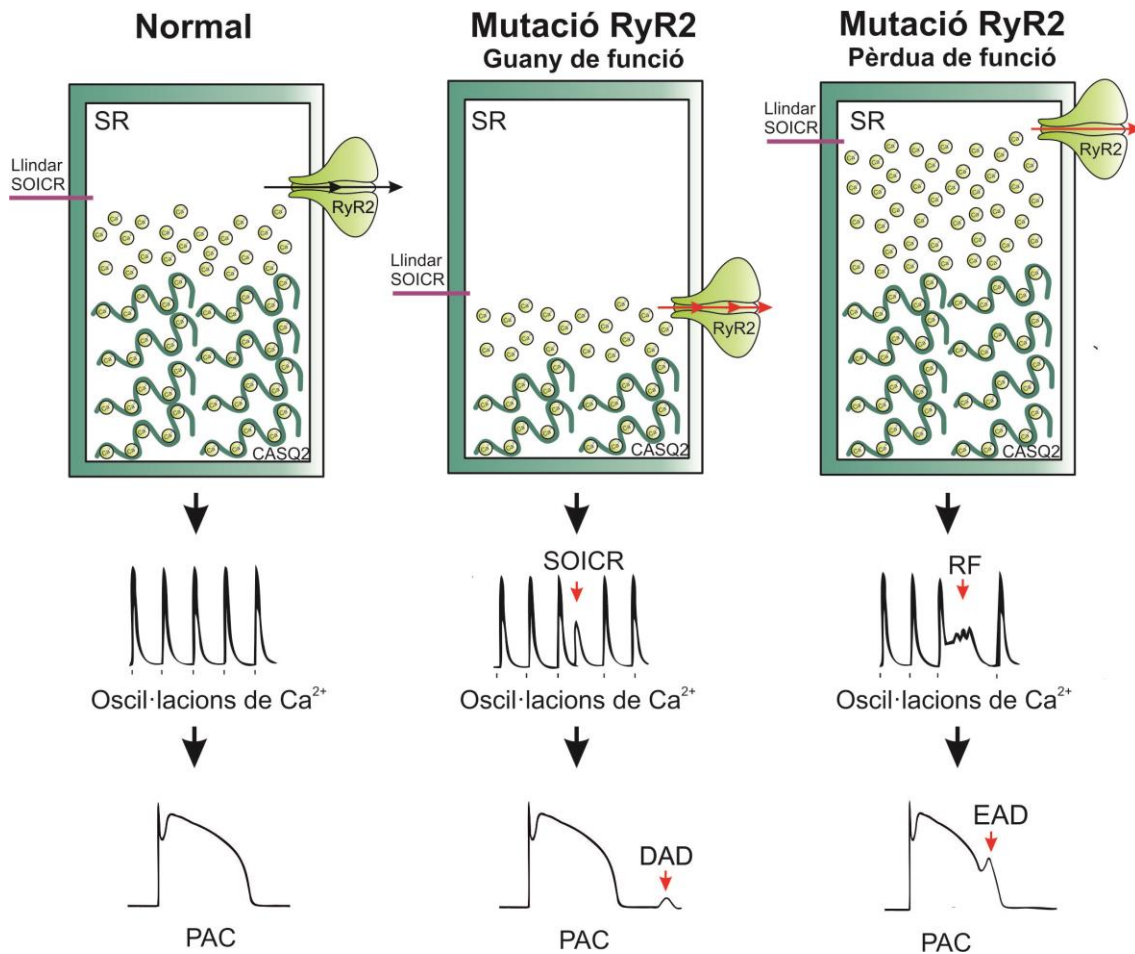


Figura 9. Mecanismes de generació d'arítmies en CPVT. Representació del reticle sarcoplasmàtic (SR), de les oscil·lacions de Ca²⁺ induïdes pel CICR i del potencial d'acció cardíac (PAC), cada transient de Ca²⁺ correspondria a un PAC. A la dreta en condicions normals. Al centre, mutació al RyR2 amb un guany de funció, que disminueix el llindar perquè es doni el SOICR, augmenten les oscil·lacions de Ca²⁺ espontànies (SOICR) que poden produir post-despolaritzacions tardanes (DAD). A l'esquerra, mutació al RyR2 amb pèrdua de funció, augmenta el llindar de SOICR, es produeixen ràfegues d'oscil·lacions de Ca²⁺ (RF) després d'una estimulació, que poden provocar post-despolaritzacions temperanes (EAD). RyR2, Receptor de rianodina tipus 2; CASQ2, Calseqüestrina.

II. Plantejament de la recerca, hipòtesis i objectius

II. Plantejament de la recerca, hipòtesis i objectius

Plantejament de la recerca

Entre el 1994 i el 2004, 4 famílies aparentment no relacionades de l'illa de Gran Canària, van ser investigades a causa de l'elevada incidència de MSC entre els seus membres (**Figura 10**). Entre aquestes 4 famílies, un total de 13 joves van patir MSC a una edat mitjana de 18 ± 8 anys, sense presentar anomalies elèctriques ni morfològiques del cor.

La investigació es van intensificar en el moment en que en una famílies (Família 1, **Figura 10**), 3 de les 4 filles van patir MSC en circumstàncies d'estrès emocional o físic. La primera, va morir mentre anava en bicicleta, la segona, mentre nadava i, la tercera, mentre es divertia en un parc d'atraccions. Després de la mort de la primera germana, es van realitzar estudis clínics a la resta de germanes i no es van localitzar anomalies elèctriques ni morfològiques del cor a cap d'elles, tot i això, dues més van patir MSC.

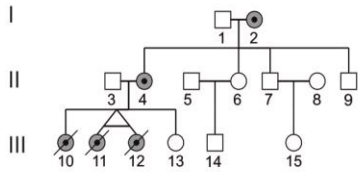
El fet de que aquestes 4 famílies residissin en una petita població del sud de l'illa de Gran Canària, població relativament aïllada, indicava que podien compartir algun grau de parentiu. L'estudi genealògic d'aquestes famílies va permetre establir que les 4 formen part d'una sola gran família que va ser fundada al 1749 i que, en l'actualitat, està formada per més de

1400 membres (**Figura 11**). La identificació d'aquesta gran família ha permès conèixer l'existència de més casos de MSC. En total, hi ha hagut 36 casos de MSC a la família, la majoria de les quals, es van donar durant exercici i/o emoció.

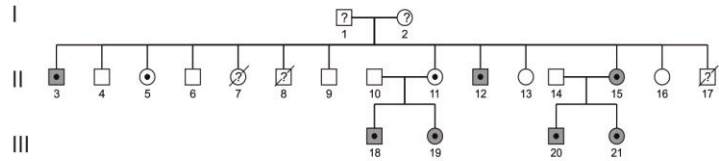
El fet que la majoria de les morts es produïssin durant estrès emocional o físic, en individus sense anomalies estructurals ni, aparentment, elèctriques del cor, va fer sospitar que la causa d'aquestes MSCs era la CPVT. Els estudis clínics realitzats als familiars basats en un protocol seriat de proves d'esforç i un monitoratge amb Holter, han demostrat la presència taquicàrdies ventriculars típiques de la CPVT en els individus afectats. Aquests estudis clínics s'han realitzat paral·lelament aquesta tesi i els han dut a terme el Dr. Wangüemert i el Dr. Ruiz del centre Cardiant de les Palmes de Gran Canaria.

Així doncs, tant les circumstàncies de les morts, com els estudis clínics, suggereixen que la causa de la MSC en els membres d'aquesta gran família és la CPVT.

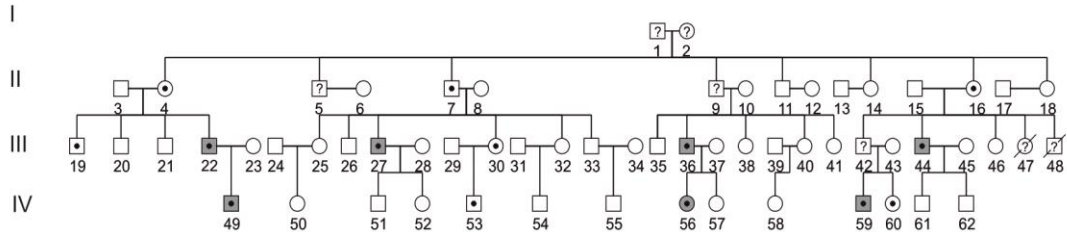
Família 1



Família 2



Família 3



Família 4

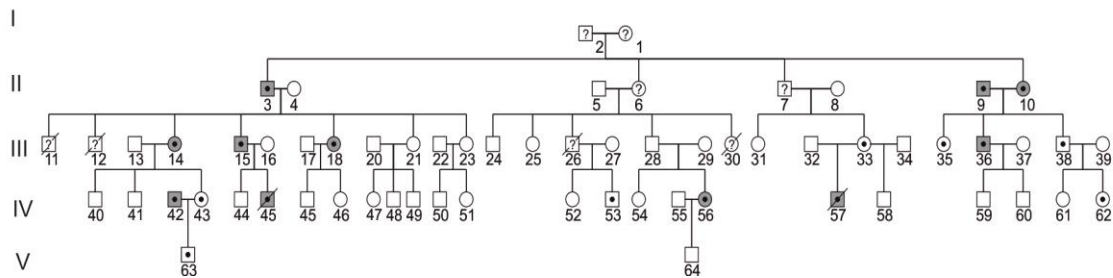


Figura 10. Pedigrís de les famílies amb alta incidència de MSC. Pedigrís de les 4 famílies de l'illa de Gran Canària amb una alta incidència de MSC. Els cercles representen dones, els quadrats representen homes; els punts indiquen els membres portadors de la mutació; els símbols grisos representen individus diagnosticats amb CPVT; i els símbols tatxats representen víctimes de MSC.

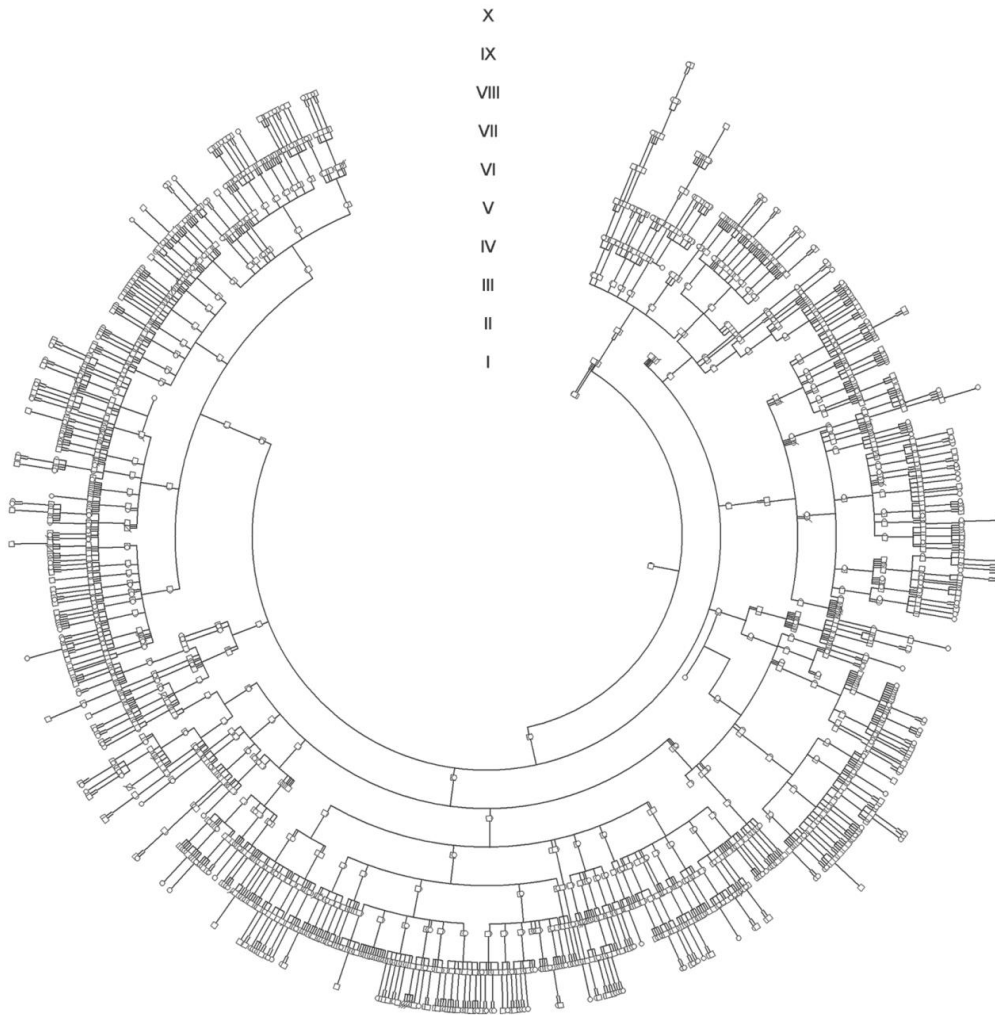


Figura 11. Pedigrí de la gran família de l'illa de Gran Canària. Pedigrí de la gran família amb més de 1400 membres vius que comparteixen un ancestre comú nascut a l'illa al 1749. El pedigrí inclou les 4 famílies a partir de les quals va començar la investigació.

Hipòtesis:

Tenint en compte el cas exposat i el marc teòric de la CPVT ens hem plantejat les següents hipòtesis:

1. La primera hipòtesi és que la CPVT, que pateixen els membres de la gran família de les Illes Canàries, està causada per una anomalia genètica en un dels principals gens associat a la malaltia.
2. La segona hipòtesi és que la mutació G357S del RyR2, trobada en els pacients afectats, altera les propietats funcionals del canal produint una alteració en la homeòstasi del Ca^{2+} intracel·lular.
3. La tercera hipòtesi és que l'alteració de les propietats funcionals del canal, en condicions d'estrès, són conseqüència de que la mutació introdueix un nou lloc de fosforilació al canal RyR2.

Objectius:

Per tal d'avaluar aquestes tres hipòtesis ens hem plantejat els següents objectius:

1. Analitzar genèticament els membres afectats per CPVT de la família realitzant una anàlisi genètica dels principals gens associats a CPVT i a MSC, i confirmar el locus de la malaltia mitjançant una anàlisi de lligament.

2. Avaluar les propietats funcionals dels canals normals i dels canals mutats en condicions basals, en termes de sensibilitat a cafeïna, de conductància del canal i d'activitat SOICR. I en condicions mimètiques a estrès, en termes de resposta a forskolina, sensibilitat a cafeïna i activitat SOICR.

3. Analitzar la fosforilació del canal RyR2 G357S després del tractament amb forskolina. I determinar la fosforilació de pèptids sintètics, corresponents a la regió de la mutació, després del tractament amb proteïna quinasa A.

III. Materials i mètodes

III. Materials i mètodes

1. *Estudi genètic*

1.1. Pacients i controls

L'estudi genètic presentat en aquest treball es va realitzar en pacients provinents del centre de cardiologia Cardiant de les Palmes de Gran Canaria que, en col·laboració amb el Hospital Clínic de Barcelona, van realitzar les proves clíniques als pacients. El protocol del test genètic va ser aprovat pel comitè ètic del Hospital Universitari de Girona Josep Trueta. Tots els individus vius, inclosos a l'estudi genètic, van donar el seu consentiment informat per escrit.

El cas índex de la família és una nena de 14 anys que va patir una MSC durant estrès emocional pocs anys després que dues de les seves germanes morissin de MSC durant un estrès físic (**Figura 16**). L'electrocardiograma basal i l'ecocardiograma realitzat en aquesta nena abans de la MSC eren normals. Un cop trobada la mutació, i gràcies a l'estudi genealògic realitzat, es va dur a terme un test genètic en cascada a tots els familiars possibles portadors de la mutació, un total de 1445 individus, 6 morts durant estrès emocional o físic.

A l'estudi es va incloure una sèrie de 290 controls sans, sense antecedents de MSC a la família, 115 individus provinents de les Illes

Canàries, sense relació amb la família de l'estudi, i 175 individus provinents de Canadà.

1.2. Extracció de ADN genòmic

L'extracció de ADN genòmic es va dur a terme a partir de mostres sanguínies de pacients i de controls. Durant l'estudi es van utilitzar dues tècniques d'extracció de ADN. En un principi es va utilitzar el kit comercial *Puregene ADN purification Kit* (Gentra System, Minneapolis, MI, USA). L'extracció de ADN amb aquest kit es va dur a terme a partir de limfòcits sanguinis obtinguts després de centrifugar la sang a 2000g. Els limfòcits es van llsar amb el reactiu *Cell Lysis* i es va eliminar la fracció proteica per precipitació química amb el reactiu *Protein precipitation*. Un cop eliminades les restes cel·lulars i proteiques es va procedir a la precipitació del ADN seguint diversos rentats per acabar rehidratant l'ADN amb *DNA Hydration Solution*. Posteriorment, es va utilitzar el robot *Chemagic Magnetic Separation module 1*, tecnologia CHEMAGEN® (PerkinElmer) que permet l'extracció de ADN automatitzada. Aquest robot utilitza un sistema de partícules magnètiques que permet obtenir una gran quantitat de ADN, d'elevada puresa, a partir de mostres de sang o saliva. Mitjançant aquesta tècnica, després de la lisis cel·lular, l'ADN s'uneix a unes partícules magnètiques que, gràcies a un imant, són transferides a diferents solucions de rentat fins arribar a la solució d'elució de l'ADN.

Un cop acabada l'extracció de l'ADN genòmic es va quantificar i evaluar la seva qualitat mitjançant NANODROP-1000 (Thermo Scientific). Les mesures de concentració es van realitzar a una absorbància (A) de 260 nm, longitud d'ona a la que absorbeixen els àcids nucleics. Per determinar la qualitat es va tenir en compte la ratio entre $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$. Es considera que la mostra de ADN és pura si aquesta ratio està entre 1.8 i 2, si és inferior a 1.8 indica la presència de contaminants com proteïnes que absorbeixen a 280nm. La segona ratio que es va utilitzar com a mesura de puresa del ADN va ser la ratio entre $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$. Valors compresos entre 2.0-2.2 indiquen que la mostra de ADN és pura, si el valor es inferior indica la presència de solvents orgànics que absorberixen a 230nm. Un cop quantificades les mostres de ADN van ser emmagatzemades a -20°C.

1.3. Amplificació , purificació i seqüenciació Sanger dels gens RyR2 i CASQ2

Es va dur a terme l'anàlisi genètic de tots els exons i part dels introns del gen *RyR2* (RefSeq:NM_001035) i *CASQ2* (RefSeq: NM_001232.3) en el cas índex. Un cop trobada la mutació es va dur a terme l'anàlisi genètic de l'exó 13 del gen *RyR2* de tots els membres de la família que podien ser portadors de la mutació. L'amplificació es va dur a terme mitjançant la Reacció en Cadena de la Polimerasa (PCR) en plaques de 96 pous. Cada reacció d'amplificació es va realitzar en un volum final de 12.5 µl,

1X Buffer (10X Buffer, 5-Prime), 0.2mM de desoxinucleòtids (dNTPs) (2.5 mM, *Deoxynucleotide Mix 5-Primer*), 1mM de mix de encebador (10mM encebador anvers i 10mM encebador revers), 20ng de ADN i 0.75U de Taq polimerasa (5U/ μ l, 5-Prime), el volum final es va ajustar amb aigua lliure de nucleases (**Taula 2**). Les amplificacions es van dur a terme amb el termociclador *Veriti™ Thermal Cycler* (Applied Biosystems). El perfil d'amplificació es va basar en una desnaturalització inicial de l'ADN, seguida d'un programa de 40 cicles de desnaturalització, hibridació i elongació; seguit d'una elongació final (**Taula 3**). La correcta amplificació dels fragments es va verificar mitjançant electroforesis en gel d'agarosa del 1.2%.

Taula 2. Components de la Reacció en Cadena de la Polimerasa

Component	Volum	Concentració final
10X Buffer	1.25 μ l	1X
dNTP (2.5mM)	1 μ l	0.2mM
Encebador anvers (10mM)	0.5 μ l	0.5mM
Encebador revers (10mM)	0.5 μ l	0.5mM
ADN (20ng/ μl)	1 μ l	4ng/ μ l
Taq polimerasa (5U/ μl)	0.15 μ l	0.75U
H₂O	8.1 μ l	
Volum total	12.5 μ l	

Taula 3. Perfil Reacció en Cadena de la Polimerasa

Etapa	Temperatura	Temps	Cicles
Desnaturalització inicial	95°C	3'	1
Desnaturalització	95°C	30''	40
Hibridació	55°C-65°C *	30''	
Elongació	72°C	45''	
Elongació final	72°C	5'	1
Final	4°C	Infinit	1

*Cada encebador té una temperatura d'hibridació determinada

Els productes correctament amplificats es van purificar mitjançant el reactiu ExoSAP-IT (United StatesBiochemical Corporation, Cleveland, OH, USA) que conté dos enzims, l'exonucleasa I, que degrada productes d'ADN de cadena senzilla, i la fosfatasa alcalina ShRimp, que degrada els dNTPS sobrants. La reacció es va dur a terme en un volum final de 3.5 µl (1 µl de reactiu i 2.5 µl de producte de PCR). Es va seguir un procés de dues etapes, la primera etapa, a 37°C durant 15', on es duu a terme la reacció de purificació, i una segona, etapa a 80°C durant 15', que inactiva els enzims.

Per a la reacció de seqüenciació es va dur a terme pel mètode de Sanger i es va utilitzar el reactiu *BigDye Terminator v3.1* (Applied Biosystems). La reacció es va dur a terme en un volum final de 5µl en plaques de 96 pous (**Taula 4**), en termocicladors Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems). El perfil de la reacció de seqüenciació es va basar en una

fase desnaturalització inicial, seguida d'un programa de 25 cicles de desnaturalització, hibridació i elongació (**Taula 5**).

Taula 4. Reacció de seqüenciació

Component	Volum
5X Sequencing Buffer	1µl
BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	0.5µl
Encebador anvers o revers (10mM)	0.5 µl
Producte purificat de PCR	1 µl
H₂O	2 µl
Volum total	5µl

Taula 5. Perfil de la reacció de seqüenciació

Etapa	Temperatura	Temps	Cicles
Desnaturalització inicial	96°C	1'	1
Desnaturalització	96°C	10''	25
Hibridació	50°C	10''	
Elongació	72°C	4'	
Final	4°C	Infinit	1

Un cop finalitzada la reacció de seqüenciació l'ADN es va precipitar mitjançant una solució d'etanol – acetat sòdic. Es van afegir 80 µl de la solució a cada producte de reacció de secuenciació i es va centrifugar a 2000g durant 45min. Es va eliminar la solució d'etanol- acetat sòdic, es van afegir 150 µl d'etanol 70% al producte precipitat i es va centifugar a

2000 g durant 10min. El producte precipitat es va resuspèndre en 10 µl de formamida (*Hi-Di™ Formamide*, Life Technologies) i es va incubar a 95°C durant 10 minuts.

El producte es va analitzar per la per electroforesis capil·lar mitjançant el seqüenciador de 16 capilars Genetic Analyzer 3130XL (Applied Biosystems).

Els resultats obtinguts es van analitzar amb amb els programes *Sequencing Analysis v.5.2* i *Seqscape v.2.5* (Applied Biosystems). Per determinar variacions en les seqüències, aquestes es van comparar amb les seqüències de referència de la isoforma ENST00000366574 en el cas del gen *RyR2* i ENST00000261448 en el cas del gen *CASQ2*. La confirmació de les variants es va realitzar mitjançant 3 PCR independents seqüenciades amb encebadors d'ambdòs sentits.

1.4. Seqüenciació de 55 gens associats a MSC per NGS

Mitjançant una tècnica de seqüenciació massiva de nova generació o NGS, es van seqüenciar 55 gens associats a MSC (**Taula 6**) en el cas índex. La integritat de l'ADN es va avaluar mitjançant un gel d'agarosa al 0.8%, i la qualitat mitjançant les ràtios d'absorbància de A_{260nm}/A_{280nm} i A_{260nm}/A_{230nm} . La concentració de ADN es va quantificar amb fluorometria Qubit (Life Technologies) per assegurar una quantitat de mostra de 3µg, quantitat necessària per seqüenciar mitjançant NGS. L'ADN es va

fragmentar per sonicació amb el Bioruptor (Diagenode) i es va preparar la llibreria d'ADN pel sistema SureSelect XT Custom 0.5-2.9Mb library (Agilent Technologies, Inc). Un cop preparada i capturada la llibreria, aquesta es va seqüenciar amb el Sistema MiSeq (Illumina) utilitzant 2x150pb de lectures per llargada. Es va utilitzar el panell de 55 gens associats a MSC de la (**Taula 6**) desenvolupat mitjançant l'eina eArray (Agilent Technologies, Inc.).

L'anàlisi bioinformàtic secundari va incloure una primera etapa de filtrat del arxius FAST-Q. Després de filtrar els arxius es van mapar amb GELI i es van unir i ordenar. Per generar el primer arxiu de les variants, es va utilitzar l'eina SAMtools v.1.18, GATK v2.4, aquestes es van anotar mitjançant les bases de dades dbSNP IDs, Exome Variant Server i 1000 Genomes. Un cop realitzat l'anàlisi secundari, es va dur a terme l'anàlisi terciari. Es va consultar la freqüència al·lèlica de cada una de les variants identificades mitjançant les bases de dades Exome Variant Server i 1000 genomes. També es va consultar la base de dades de mutacions HGMD per identificar mutacions patogèniques prèviament descrites. Finalment les variants es van filtrar segons la freqüència de l'al·lel minoritari (MAF) i es van descartar totes aquelles variants amb un $MAF > 1\%$ o trobades, més de 4 vegades, en altres individus.

Taula 6. Panell de 55 gens associats a MSC

Malaltia	Gens
Síndrome de Brugada	<i>CACNA1C, CACNB2, GPD1L, HCN4, SCN5A</i>
QTL	<i>ANK2, CACNA1C, CAV3, KCNE1, KCNE2, KCNH2, KCNJ2, KCNQ1, RYR2, SCN4B, SCN5A</i>
QTCurt	<i>CACNA1C, CACNB2, KCNH2, KCNJ2, KCNQ1</i>
CPVT	<i>CASQ2, KCNJ2, RYR2</i>
Cardiomiopatia Hipertròfica	<i>ACTC1, ACTN2, CAV3, CSRP3, GLA, JPH2, LAMP2, LDB3, MYBPC3, MYH6, MYH7, MYL2, MYL3, MYOZ2, PDLIM3, PLN, PRKAG2, RYR2, TCAP, TNNC1, TNNI3, TNNT2, TPM1, TTN, VCL</i>
Cardiomiopatia dilatada	<i>ACTC1, ACTN2, CAV3, CRYAB, CSRP3, DES, DMD, DSC2, DSG2, DSP, EMD, LAMP2, LDB3, LMNA, MYBPC3, MYH6, MYH7, PKP2, PLN, SCN5A, SGCD, TAZ, TCAP, TNNC1, TNNI3, TNNT2, TPM1, TTN, VCL</i>
DAVD	<i>DES, DSC2, DSG2, DSP, JUP, LMNA, PKP2, PLN, TGFB3, TTN</i>

1.5. Estudis *in silico*

Per determinar si les variants trobades ja estaven descrites o existien en població general, es va fer una recerca de les variants a la base de dades de mutacions “*Gene Mutation Database*” (HGMD) i a les bases de dades internacionals *dbSNP*¹⁰⁹, *1000 Genomes*¹¹⁰ i *Exome Variant Server* (NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP), Seattle, WA).

La potencial patogenicitat de les variacions es va examinar amb diferents eines *in silico*:

- *Polyphen-2*¹¹¹: prediu l'impacte de la substitució d'un aminoàcid en l'estabilitat i funció de la proteïna, en base a l'estructura i a la homologia de la seqüència durant l'evolució. Aquesta eina ens don una predicció de la patogenicitat qualitativa de la mutació, que pot ser probablement patogènica, possiblement patogènica, benigne o desconeguda, i una puntuació que representa la probabilitat de que la substitució sigui perjudicial. Valors pròxims a 1 indiquen que la probabilitat de que la variació sigui perjudicial és alta.
- *Condel*¹¹²: utilitza una puntuació consens sobre la patogenicitat de la variació integrant les puntuacions de 3 eines *in silico*, Polyphen-2, SIFT¹¹³ i MutationAssessor¹¹⁴. Eines *in silico* que es basen en la homologia de les seqüències en l'evolució i, algunes d'elles, també tenen en compte les similituds fisio-químiques dels aminoàcids. Aquesta eina ens dona una predicció qualitativa neutral o deletèria i una puntuació que informa de la probabilitat de que la substitució sigui deletèria. Valors pròxims a 1 indiquen que la probabilitat de que la variació sigui patogènica és alta.
- *Provean*¹¹⁵: prediu com una variació en la seqüència d'una proteïna pot afectar a la seva funció. La puntuació es basa en l'alineament de la seqüència amb seqüències homòlogues. La puntuació es

compara amb un llindar predeterminat (-2.5). La variant és qualificada com a deletèria si la puntuació és igual o inferior a aquest llindar, i si la puntuació és superior és qualificada com a neutre.

1.6. Anàlisi de marcadors STR's

Es van analitzar 6 marcadors STR's (short tandem repeats) de la regió cromosòmica 1q41-1q44 de 23 familiars corresponents a dos nuclis de la gran família per, posteriorment, dur a terme un anàlisi de lligament genètic. Els 6 marcadors STR (**Taula 7**) es van escollir de la base de dades UniSTS del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI)¹¹⁶, tenint en compte una distància màxima entre ells de 9Mb.

Els marcadors es van amplificar mitjançant PCR i els encebadors utilitzats es van extreure de la base de dades UniSTS (NCBI)¹¹⁶. Els marcadors D1S103, D1S459, D1S163, D1S1567, D1S2679 van ser amplificats amb la reacció i perfil de PCR descrit anteriorment (**Taula 2**) i en les condicions que es descriuen a la **Taula 3**. El marcador D1S2785 es va amplificar mitjançant la Taq polimerasa KAPA2G Robust HotStart ADN Polymerase (Kapa Biosystems). La reacció d'amplificació del marcador D1S2785 es va realitzar en un volum final de 12.5 µl, 0.5X Buffer GC (5X Buffer, Kapa Biosystems), 0.2mM de dNTPs, (2.5 mM), 1mM de mix d'encebadors (10mM encebador anvers i 10mM encebador

revers), 20ng d'ADN i 0.75U de KAPA2G Robust HotStart ADN Polymerase (5U/ μ l, Kapa Biosistems) (**Taula 8**). El perfil utilitzat per dur a terme l'amplificació és un perfil en Touchdown que consta d'una primera fase de desnaturalització; seguida de 15 cicles de desnaturalització, hibridació, que comença a 65°C i es va reduint 0.5°C per cicle fins arribar a 58°C, i elongació; aquests 15 cicles van seguits d'una altra fase de 25 cicles de desnaturalització, hibridació i elongació; finalment, es produeix l'elongació final (**Taula 9**).

Per a cada producte es va preparar una mix amb 10 μ l de formamida (*HiDi™ Formamide*), 0.1 μ l de marcador molecular GeneScan™ 500 LIZ™ dye Size Standard (Live technologies) i 1 μ l de producte de PCR i es va incubar a 95°C durant 5'. El producte de PCR es va analitzar per electroforesis capil·lar amb el Genetic Analyzer 3130XL (Applied Biosystems). Els resultats obtinguts es van examinar amb els *software* Gene Mapper (Applied Biosystems).

Taula 7. Marcadors *Short Tandem Repeats* (STR)

Marcador STR	Posició en centimorgans (cM)	Repetició nucleotídica	Mida del producte (pb)
D1S103	266.8	CA	88-102
D1S459	271.238	CA	148-160
D1S163	276.637	TG	199-215
D1S1567	281.167	CA	252-264
D1S2785	288.318	CA	172-186
D1S2679	294.602	CA	196-204

Taula 8. Components PCR amb *KAPA2G Robust HotStart ADN Polymerase*

Component	Volum	Concentració final
0.5X Buffer GC	1.25 µl	1X
0.2mM de dNTPs	1 µl	0.2mM
1mM de mix d'encebadors	1 µl	1M
ADN (20ng/ µl)	1 µl	4ng/ µl
<i>KAPA2G Robust HotStart ADN Polymerase</i> (5U/µl)	0.15 µl	0.75U
H₂O	8.1 µl	
Volum total	12.5 µl	

Taula 9. Perfil de PCR en *Touchdown*

Etapa	Temperatura	Temps	Cicles
Desnaturalització inicial	95°C	4'	1
Desnaturalització	94°C	30''	15
Hibridació	65°C - 0.5°C per cicle	30''	
Elongació	72°C	45''	
Desnaturalització	94°C	30''	25
Hibridació	58°C	30''	
Elongació	72°C	45''	
Elongació final	72°C	5'	1
Final	4°C	Infinit	

1.7. Anàlisi de lligament genètic

El lligament genètic es va dur a terme a partir dels resultats obtinguts en l'anàlisi dels marcadors STR's dels 23 familiars, entre els quals hi havia

12 membres afectats, 9 no afectats i 2 de fenotip desconegut (**Figura 18**). Els resultats dels marcadors STR's, obtingut en parells de bases, es van codificar en números del 1 al 6 per a cada marcador.

Es va realitzar un anàlisi de lligament de múltiples punts i paramètric, en el que s'analitzen diferents marcadors al llarg d'una regió i es requereix l'ajust de la mostra a un model d'herència concret. L'anàlisi de lligament es va realitzar mitjançant el programa MERLIN (University of Michigan). Es va assumir un patró d'herència dominant, amb penetrància incompleta de la malaltia del 83%²³ i amb una freqüència de l'al·lel afectat de 0.0001, donat que és una malaltia rara. Les freqüències al·lèliques de cada marcador van ser estimades automàticament pel programa MERLIN comptant el al·lels observats en cada un dels individus. La visualització dels haplotips es va dur a terme mitjançant el programa HAPLOPAINTER¹¹⁷.

Mitjançant aquesta anàlisi es va obtenir la puntuació *LOD score* que compara la probabilitat de que dos locus estiguin lligats amb que no ho estiguin, i que estiguin units per atzar. Si el valor del *LOD score* és igual o superior a 3, existeix lligament genètic entre els locus; si el valor és entre 3 i -2 no es pot afirmar ni rebutjar que existeixi lligament genètic entre els locus; i si el valor és inferior a -2 no existeix lligament genètic entre els locus.

2. Estudi de la funció del canal RyR2

2.1. Cultius cel·lulars

Com a model cel·lular per dur a terme l'estudi funcional de la mutació G357S del RyR2 es van generar dues línies estables i induïbles de cèl·lules HEK293 (HEK293_{RyR2}) que expressen RyR2 de ratolí amb fenotip salvatge (WT) o amb la mutació (G357S). Aquests cultius es van generar mitjançant el kit Flp-In T-Rex Core Kit (Invitrogen). El cDNA codificant per RyR2 WT o G357S es va subclonar en un vector d'expressió induïble, pcADN5/FRT/TO. Posteriorment, aquest vector es va cotransfectar juntament amb el vector pOG44, que conté una recombinasa, en cèl·lules T-REx-293 Flp-In. Un cop cotransfectades les cèl·lules van ser seleccionades amb 200µg/ml de hygromicina en medi DMEM. Les cèl·lules resistents es van agrupar i van ser emmagatzemades a -80°C. Les línies cel·lulars van ser establertes i proporcionades per el Dr. Wayne Chen del departament de fisiologia i biofísica de la Universitat Calgary de Canada. Un cop establertes les línies cel·lulars, van ser subcultivades en el nostre laboratori de manera rutinària amb medi de cultiu DMEM (GIBCO-Invitrogen) suplementat amb FBS al 10% (GIBCO-Invitrogen) antibiòtic-antifúngic al 1% (GIBCO-Invitrogen) i Glutamax al 1% (GIBCO-Invitrogen) a 37 °C, 5% de CO₂.

La inducció de l'expressió del RyR2 WT o G357S en els cultiu de cèl·lules HEK293_{RyR2} es va realitzar amb 1µg/ml de tetraciclina 48h abans de realitzar els experiments.

2.2. Anàlisi de l'expressió de RyR2 per immunofluorescència

Les cèl·lules HEK293_{RyR2} WT i G357S es van cultivar en portaobjectes i van ser induïdes. Els controls d'expressió es van realitzar amb cèl·lules HEK293_{RyR2} no induïdes. Les cèl·lules es van rentar 3 vegades amb PBS (*Phosphate Bufferd Saline*), es van fixar amb paraformaldehid 4% durant 5 minuts i es van tornar a rentar 3 vegades amb PBS. Les cèl·lules es van permeabilitzar amb Triton X al 0.1% durant 15 minuts, es van bloquejar amb 0.1% d'albúmina sèrica bovina (BSA) durant 30 minuts i es van incubar durant tota la nit amb l'anticòs primari contra RyR2 (Mouse anti-RyR2 monoclonal, Affinity Bioreagents) diluït en BSA al 0.1% en PBS. Després, les cèl·lules es van rentar amb PBS i es van incubar durant 1h amb l'anticòs secundari conjugat amb un fluorocrom a temperatura ambient (Alexa 488 conjugated rabbit anti-mouse antibody, Invitrogen). Un cop incubades amb l'anticòs secundari les cèl·lules es van rentar amb PBS i es van incubar amb 0.1 µg/ml de DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) per marcar el nucli cel·lular. Després del rentat final, el portaobjectes es van muntar amb medi de muntatge (Prolong Antifade, Invitrogen) i es van emmagatzemats a 4°C per posteriorment ser

analitzats. Les senyals de fluorescència van ser analitzades mitjançant un microscopi d'epifluorescència directe Nikon Eclipse 50i, amb un objectiu de 40X equipat amb la càmera digital Digital Sight DS 2Mv CCD (Figura 12).

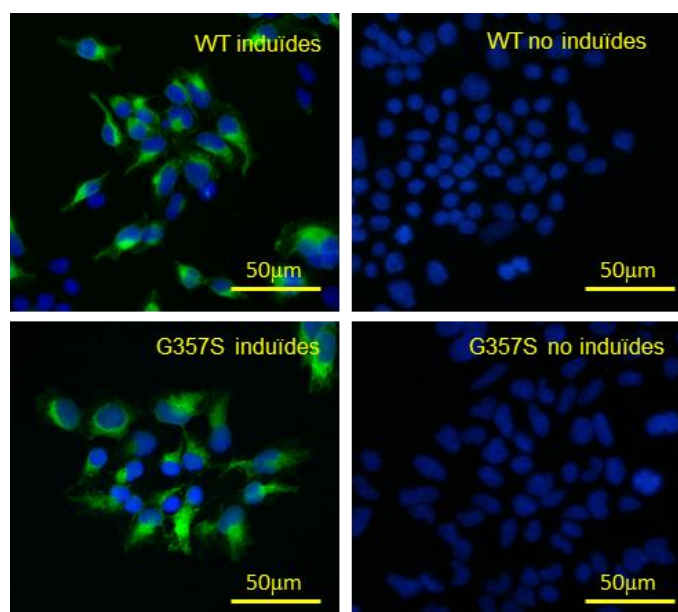


Figura 12. Immunofluorescència de cèl·lules HEK293_{RyR2} WT o G357S. A dalt s'observen les cèl·lules amb el canal WT induïdes (esquerra) i no induïdes (dreta). A sota s'observen les cèl·lules amb RyR2 G357S induïdes (esquerra) i no induïdes (dreta). El nucli de les cèl·lules està marcat amb DAPI (blau) com a colorant de contrast i el RyR2 en verd (Alexa 488 conjugated rabbit anti-mouse antibody).

2.3. Anàlisi d'expressió de RyR2 per western blot

Les cèl·lules HEK293_{RyR2} WT o G357S induïdes, es van cultivar en plaques per cultiu cel·lular de 35mm². Per extreure les proteïnes de les cèl·lules, aquestes es van rentar amb PBS, i es van lliurar amb tampó de lisi (Taula 10) amb inhibidor de proteases (Roche Applied Science,

Indianapolis, IN, USA) a 4°C, durant 30min. Les cèl·lules es van aixecar amb l'ajuda d'un *scraper*, es van centrifugar a 16.000g durant 15', a 4°C i es va recuperar el sobrenedant. La quantificació de proteïna es va dur a terme amb l'assaig de BCA (BCA Assay Kit, ThermoScientific) i es va utilitzar el lector de plaques Microplate Reader (Biorad).

Les proteïnes es van separar mitjançant electroforesi desnaturalitzant en gel d' SDS-acrilamida, compost per un gel d'apilament (*stacking*) i un gel d'acrilamida al 6% (**Taula 11**). Les mostres es van diluir amb el tampó de càrrega *Loading Buffer 6X* (**Taula 10**) i es van bullir 5', a 95°C. Es van carregar entre 10 i 20 µg de mostra al gel, juntament amb el marcador de pes molecular *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific). La separació de proteïnes es va dur a terme amb el tampó *Laemli Running Buffer 10X* (**Taula 10**) al 1X en dues fases, primer es va aplicar un voltatge de 40V durant 30 min per alinear les proteïnes, i després, un voltatge de 120V durant 1h30' per separar-les. Un cop separades les proteïnes, es van transferir a una membrana de PVDF (*polyvinylidene difluoride*) en tampó de transferència (*10X Western Blot Transfer Buffer*) (**Taula 10**) al 1X amb un 20% de metanol, a un voltatge constant de 85V durant 3 hores a 4°C.

Taula 10. Tampons per a Western Blot

Tampó	Composició
Tampó de lisi	50mM Tris/HCl, pH 7.4; 150mM NaCl; 1mM EDTA; 1% NP40.
Loading Buffer 6X	375 mM TrisCl/SDS, pH 6.8; 30% glicerol; 10% SDS, 0.6M DTT, 0.012% bromphenol blue
Running buffer	3% Tris; 14.4% glicina; 0.5% SDS
10X Western Blot Transfer Buffer	2.4% Tris; 11.2% Glicina ; 1% SDS

Taula 11. Composició del gels d'acrilamida per a Western blot

Gel stacking	Gel al 6% d'acrilamida
H ₂ O	H ₂ O
0.5M Tris (pH6.8)	1.5M Tris (pH6.8)
30% Acrilamida	30% Acrilamida
10% SDS	10% SDS
10% APS*	10% APS
TEMED**	TEMED

* Persulfat amònic, ** Tetramethylethylenediamine

La membrana es va bloquejar amb llet al 5% en PBS-Tween durant 1h a T^a ambient i va ser incubada amb l'anticòs primari contra RyR2 (*Mouse anti-RyR2 monoclonal*, Affinity Bioreagents) diluït 1:1000, durant tota la nit, a 4°C, en agitació. La membrana es va rentar tres vegades, dues amb PBS-Tween i una vegada amb PBS durant 10', en agitació. A continuació, la membrana es va incubar amb l'anticòs secundari conjugat

contra ratolí (*anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated*, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) diluït 1:2000 durant 1h, en agitació. Posteriorment, es van fer 3 rentats, dos amb PBS-Tween i un amb PBS, durant 10', en agitació. Les senyals es van detectar mitjançant una reacció de quimioluminescència amb el kit *SuperSignal West Femto Chemiluminiscent substrate* (Pierce), i es van visualitzar sobre pel·lícules fotogràfiques (AmerSham) (**Figura 13**).

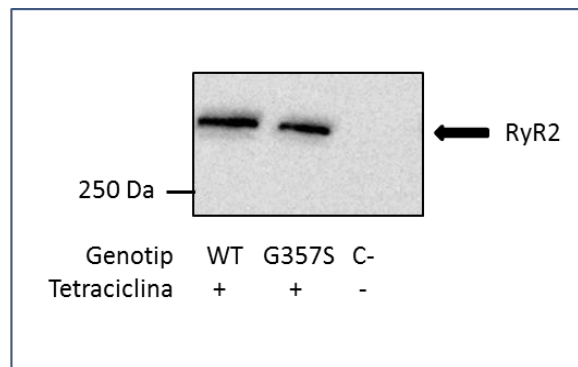


Figura 13. Western blot de la proteïna RyR2 en lisats de cèl·lules HEK293_{RyR2} WT o G357S. La imatge mostra les bandes de RyR2 obtingudes en els lisats de les cèl·lules que expressen RyR2 WT (esquerra) RyR2 G357S (mig) o que no expressen RyR2 (dreta) després de haver estat induïdes amb tetraciclina(+). El grau d'expressió del canal RyR2 es similar en ambdós models cel·lulars i les cèl·lules HEK293_{RyR2} sense induir no tenen expressió endògena de la proteïna RyR2. A l'esquerra es mostra la banda de 250kDa del marcador, que és la banda més propera a RyR2 (564kDa).

2.4. Purificació de RyR2 en gradient de sacarosa continu

Les cèl·lules HEK293_{RyR2} WT o G357S es van cultivar en flascons de 175cm² i van ser induïdes. Un cop els cultius eren confluents, es va eliminar el medi DMEM i es van rentar les cèl·lules 2 vegades amb PBS. Les cèl·lules es van incubar amb 7ml de PBS durant 20' per aixecar-les, es van recol·lectar, quantificar i centrifugar a 1500 rpm durant 5' (Eppendorf Centrifuge 5810 i rotor Eppendorf A-4-62). Un cop descartat el sobrenedant, es van afegir 3 ml de tampó de lisis-CHAPS (**Taula 12**) suplementat amb inhibidor de proteases (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) i es va deixar incubar durant 1h en gel. Després de la incubació, la mostra es va centrifugar a 14400g, durant 30 minuts, a 4° (Allegra X-22R Centrifuge Beckman Coulter, i rotor Beckman JA-14) per descartar les fraccions nuclears i mitocondrials. El sobrenedant es va recol·lectar i es va guardar en gel. Les solucions de sacarosa al 7.5% i al 25% es van preparar en tampó de gradient (**Taula 12**) suplementat amb inhibidors de proteases (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) i amb 2.5mM de DTT just abans de fer les solucions de sacarosa. A continuació, mitjançant l'aparell per generar gradients continus, es van generar els gradients continu de sacarosa del 25% al 7.5% en dos tubs de centrifuga de 13.2ml SW41. Un cop formats els gradients, amb molt de compte, s'hi van transferir 2.5ml de mostra i es van centrifugar a

140000g durant 17 hores a 4° amb la ultracentrífuga (Sorvall Discovery 90SE i rotor Beckman SW-41). Un cop centrifugat els gradients, es van recol·lectar en fraccions de 0.7 ml en tubs eppendorfs, mitjançant un forat al fons de cada tub SW41 de 13.2ml i es van posar en gel. Les fraccions es van analitzar per Dot Blot.

Taula 12. Tampons per a la purificació de RyR2 en gradient de sacarosa

Tampó	Composició
Tampó de lisis-CHAPS	25mM Tris/Hepes; 137mM NaCl; 0.3mM EGTA; 0.1mM CaCl ₂ ; 1% CHAPS; 0.5% Fosfatidilcolina
Tampó de gradient	25mM Tris/Hepes; 300mM NaCl; 0.3mM EGTA; 0.1mM CaCl ₂ ; 10X (3% CHAPS + 1.6% Fosfatidilcolina)

2.5. Dot blot

Es van transferir 2µl de cadascuna de les fraccions del gradient en una membrana de nitrocel·lulosa (Protran, Whatman), com a control positiu, es va utilitzar una mostra de lisat de HEK293_{RyR2} induïdes i, com a control negatiu, un lisat de cèl·lules HEK293. Quan les mostres de la membrana es van assecar, la membrana es va bloquejar incubant-la durant 1h amb llet al 5% en PBS-Tween. Després del bloqueig, la membrana es va incubar en agitació durant 1h amb l'anticòs primari anti-RyR2 (*Mouse anti-RyR2 monoclonal*, Affinity Bioreagents) diluït 1:1000. Posteriorment, es van fer 3 rentats de 10', 2 amb PBS-Tween i un amb PBS. Un cop fets

els rentats, la membrana es va incubar amb l'anticòs secundari contra ratolí (*anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated*, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) diluït 1:2000 durant 1h en agitació. Un cop transcorreguda aquesta hora, la membrana es va tornar a rentar 3 vegades durant 10', 2 amb PBS-Tween i 1 amb PBS. Les senyals es van detectar mitjançant una reacció de quimioluminescència amb el kit *SuperSignal West Femto Chemiluminiscent substrate* (Pierce), i es van visualitzar sobre pel·lícules fotogràfiques (AmerSham). (Figura 14)

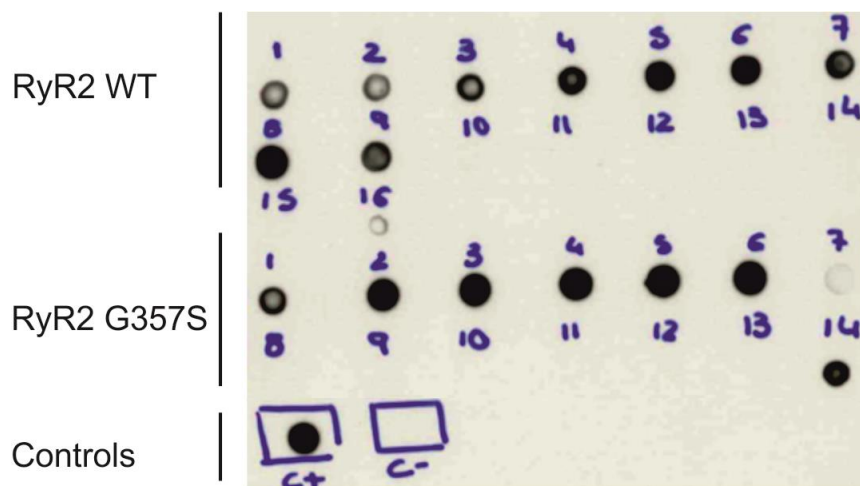


Figura 14. Dot blot contra RyR2 de les fraccions obtingudes del purificació per gradient continu de sacarosa. La imatge mostra les marques obtingudes per RyR2 en les diferents fraccions dels gradients de sacarosa. A dalt, fraccions obtingudes de cèl·lules que expressen RyR2 WT, les fraccions que van de la 1 a la 9 estan enriquides amb RyR2. Al mig, fraccions obtingudes de cèl·lules que expressen RyR2 G357S, les fraccions que van 1 a la 6 i la fracció 14 estan enriquides amb RyR2, aquesta última per contaminació. A baix, control positiu de lisats de HEK293_{RyR2} WT induïdes (C⁺) i control negatiu de cèl·lules HEK293_{RyR2} WT sense induir (C⁻). Els números indiquen les diferents fraccions obtingudes en els gradients.

2.6. Registres de canals únics en bicapes lipídiques artificials

Per formar les bicapes lipídiques, es van utilitzar dos tipus de lípids, fosfatidiletanolamina i fosfatidilserina (10µg/µl en cloroform, Avanti Polar Lipids) i es va preparar una solució 1:1 en decà. Es van transferir 18 µl de fosfatidiletanolamina a un tub de vidre i es va evaporar el cloroform amb N₂ gas. Posteriorment, en el mateix tub, es va dur a terme el mateix procediment amb la fosfatidilserina. Un cop evaporat s'hi van afegir 30 µl de decà (SIGMA). Tot el procediment es va dur a terme en gel.

Pels registres de canals únics es va utilitzar una cambra per a la formació de bicapes lipídiques (Librede) amb una membrana de tefló amb forat de 200 µm de diàmetre (Librede). La membrana separa la cambra en dos compartiments, compartiment Cis (citoplasmàtic) i compartiment Trans (luminal). Abans de muntar la cambra, el forat de 200 µm es va pintar amb solució lipídica (fosfatidiletanolamina i fosfatidilserina) i es va assecar amb N₂ gas. Un cop muntada, es va posar a la cambra de Faraday, es van omplir els dos compartiments amb 1.5ml de solució de registre (50mM KCL i 25mM Hepes) i es van connectar els elèctrodes. Els registres es van realitzar amb el programa Clampex (Axon instruments) a través d'un amplificador (Axon). Com a suport, es va utilitzar un oscil·loscopi (Hameg). Abans de crear la bicapa, es va aplicar un pols triangular de ± 50mV i posteriorment es va formar la bicapa

pintant el forat amb la solució de lípids. Un cop formada, es va comprovar que fos estable mitjançant l'aplicació d'un pols quadrat de 100 a -100mV durant 2 minuts. Quan es va certificar que la bicapa era estable, es van afegir 4µl de la mostra sonicada (RyR2 purificat per gradient de sacarosa de les fraccions 5 i 6 de la **Figura 14**) al compartiment Cis de la cambra. Seguidament, per obtenir una concentració final de 100µM de Ca²⁺ a la solució de registre, es van afegir 15µl de CaCl₂ (10mM) a cadascuna de les cambres. La concentració de K⁺ es va anar incrementant a les dues cambres a partir d'una solució KCL 2.7M fins arribar a una concentració de 250mM a la solució de registre. Per observar la incorporació de canals a la bicapa es va aplicar un voltatge de +50mV. Un cop incorporat el canal, es va analitzar la seva activitat a diferents voltatges de -80 a +80mV, en intervals de 20mV. Les amplituds dels esdeveniments a cada voltatge van ser mesurades pel programa Clampfit (Axon instruments). Els valors de corrent (I) del canal obert es van obtenir a cada voltatge (V) i es van ajustar per regressió lineal (corba IV). L'anàlisi de la pendent d'aquesta recta ens va permetre determinar la conductància unitària del canal (g).

2.7. Imatges de calci intracel·lular

Les oscil·lacions de Ca^{2+} intracel·lulars en cèl·lules HEK293_{RYR2} que expressen el canal WT o amb la mutació G357S es van mesurar amb imatges de microscòpia de fluorescència. Les cèl·lules es van carregar amb l'indicador de Ca^{2+} fluorescent fluo-4-acetoxymethyl ester (fluo-4AM, 5 μM , Invitrogen) en solució Krebs-Ringer-Hepes (KRH) (**Taula 13**) durant 30 minuts a temperatura ambient, just abans de l'experiment. Les imatges de Ca^{2+} es van analitzar en un microscopi de fluorescència invertit Nikon Eclipse Ti. La fluorescència del Fluo 4-AM va ser capturada a una freqüència de 0.5Hz, amb un temps d'exposició de 10ms, mitjançant diferents objectius, de 10X a 40X Plan Fluo i un conjunt adequat de filtres d'excitació i emissió. La llum d'excitació i els obturadors es troben integrats al sistema d'il·luminació Lambda DG4 (Sutter Instruments, Novato, CA). Les imatges van ser adquirides amb la càmera multiplicadora d'electrons CCD (Hamamatsu C900-13, Hamamatsu, Japan). L'adquisició i l'anàlisi de les imatges es van realitzar amb el software MetaFluor Imaging System (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) i les regions d'interès (ROI) van ser seleccionades mitjançant un algoritme incorporat en el software i corregit després de la inspecció ocular de cada un dels arxius.

Taula 13. Tampó Krebs-Ringer-Hepes (KRH)

Compost	Concentració
NaCl	125 mM
KCl	5 mM
KH₂PO₄	1.2 mM
Glucosa	6 mM
MgCl₂	1.2mM
Hepes	25 mM
CaCl₂	100 µM
pH 7.4	

2.8. Anàlisi de sensibilitat a cafeïna

Les cèl·lules es van cultivar durant 48h en cobreobjectes pretractats amb polilisina i van ser induïdes. Posteriorment es van carregar amb fluo-4AM en solució KRH (**Taula 13**). El cobreobjectes es va muntar en una cambra de perfusió (Warner Instruments) i aquesta en el microscopi invertit. Les cèl·lules es van perfondre de manera global i contínua amb solució KRH i, de de manera local, amb diferents concentracions de cafeïna (0.1mM, 0.25mM, 0.5mM, 1mM, 2mM, 5mM, 10mM, 20mM) en solució KRH, mitjançant una pipeta de perfusió de vuit canals posicionada amb un microposicionador. Aquesta perfusió local va ser controlada mitjançant un sistema de vàlvules (cFlow Cell Microcontrols, Norfolk, VA, USA) operat digitalment durant l'adquisició de les imatges.

Per a l'anàlisi de sensibilitat a cafeïna en presència de forskolina, les cèl·lules es van carregar amb fluo-4AM i es van incubar amb solució KRH-5 μ M de forskolina durant 30'. Les cèl·lules es van perfondre de manera global i contínua amb solució KRH-5 μ M de forskolina i, localment, amb diferents concentracions de cafeïna (0.005mM, 0.01mM, 0.025mM, 0.05mM, 0.1mM, 0.25mM i 0.5mM) en KRH-5 μ M de forskolina, a temperatura ambient.

L'adquisició de les imatges es va dur a terme amb un objectiu 10X Plan Fluor. L'anàlisi dels traços de fluorescència, que es van obtenir d'una mitjana de 120 cèl·lules per experiment, es va realitzar amb el programa Originpro 8 (Originlab Corporation). Les corbes dosi resposta es van analitzar amb el programa GraphPad Prism 6 (GraphPad software) i es van ajustar a un model dosi resposta amb la funció ($Y=Bottom + (Top-Bottom)/(1+10^{((Log EC_{50}-X)*HillSlope)})$), on *Top* i *Bottom* són les respostes mínima i màxima respectivament, *x* és la concentració de cafeïna, HillSlope és la constant de la funció sigmoïdal, EC_{50} és la concentració màxima efectiva i $Log EC_{50}$ és el punt mig de la corba on $EC_{50}=10^{LOGx0}$. Les diferències entre els EC_{50} es van analitzar mitjançant una prova T-Student i les diferències entre els punts de les corbes mitjançant una ANOVA de dos factors.

2.9. Anàlisi de l'activitat SOICR

Les cèl·lules HEK293_{RyR2} WT o G357S es van cultivar en plaques de 24 pous pretractades amb polilisina i es van induir. Les cèl·lules es van carregar amb Fluo 4-AM i es van incubar durant 30' en diferents concentracions de Ca²⁺ extracel·lular (0.05mM, 0.1mM, 0.2mM, 0.3mM, 0.5mM, 0.75mM i 1mM) en KRH a temperatura ambient. Per analitzar l'acció de la forskolina en l'activitat SOICR, les cèl·lules es van incubar durant 30' amb diferents concentracions de forskolina (0µM, 0.1µM, 0.5µM i 5µM) en solució KRH 0.1mM de Ca²⁺ a temperatura ambient. I per a l'anàlisi de l'activitat SOICR en presència de forskolina, les cèl·lules es van incubar durant 30' en diferents concentracions de Ca²⁺ (0.1mM, 0.2mM, 0.3mM i 0.5mM) en absència o presència de 5µM de forskolina.

Les imatges de Ca²⁺ es van adquirir a una freqüència de 0.5Hz amb un objectiu de 40X Plan Fluor durant 2 o 4 min. Cada una de les cèl·lules va ser considerada ROI d'on es van extreure els valors de fluorescència respecte el temps, que es van analitzar amb el programa Clampfit (MDS Analytical Technologies). Per a l'anàlisi de l'activitat SOICR, es van determinar el nombre de cèl·lules amb oscil·lacions espontànies de Ca²⁺ respecte el total de cèl·lules, a diferents concentracions de Ca²⁺, i el nombre d'oscil·lacions espontànies de Ca²⁺ per cada cèl·lula amb activitat SOICR, en les diferents concentracions de Ca²⁺. D'aquestes anàlisis, es van realitzar les corbes dosi-resposta ajustades a la funció (y

= $A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((\text{LOG}x0-x)*p)})$, de les quals es va extreure EC_{50} . Les diferències entre les EC_{50} es van analitzar mitjançant una T-student, amb el programa Originpro8 (Originlab Corporation). Per l'activitat SOICR en presència de forskolina, es va determinar la freqüència de les oscil·lacions espontànies de Ca^{2+} de cada cèl·lula amb activitat SOICR i la seva amplitud. Els resultats finals es van analitzar amb el programa Originpro8 (Originlab Corporation). Les diferències entre els EC_{50} es van analitzar mitjançant una prova T-Student. Mentre que les diferències entre els punts de les corbes dosi-resposta i les diferències entre grups en l'activitat SOICR es van analitzar mitjançant una ANOVA de dos factors.

2.10. Anàlisi de la fosforilació del residu S2808 del RyR2

Les cèl·lules HEK293_{RyR2} WT es van sembrar en plaques de 6 pous i van ser induïdes. Posteriorment, les cèl·lules es van rentar 3 vegades amb PBS i es van incubar durant 30 minuts en solució KRH 0.1 mM de Ca^{2+} en diferents concentracions de forskolina (0, 0.1 i 1 μ M). Després de la incubació, les cèl·lules es van lissar amb tampó de lisis (**Taula 10**) suplementat amb inhibidors de fosfatases, 100nM Okadaic Acid (Cell Signaling Technology) i 20nM calyculin A (Cell Signaling Technology) i inhibidors de proteases (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA). Els lisats cel·lulars es van recol·lectar, centrifugar i es va mesurar la

concentració de proteïnes en cadascuna de les mostres per dur a terme la tècnica de Western Blot (pàgina 109). En aquest cas, es van carregar dues rèpliques de cada mostra per ser transferides a membranes de PVDF diferents. Una de les membranes es va incubar amb l'anticòs primari contra el residu S2808 de RyR2 (*Rabbit anti-RyR2 Phospho Serine-2808 polyclonal antibody*, Badrilla) en dilució 1:1000 i amb l'anticòs secundari contra conill (*anti-Rabbit horseradish peroxidase-conjugated antibody*, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) diluït 1:2000. L'altra membrana, es va incubar amb l'anticòs primari contra RyR2 (*Mouse anti RyR2 monoclonal*, Affinity Bioreagents) en dilució 1:1000 i amb l'anticòs secundari contra ratolí (*anti mouse horseradish peroxidase-conjugated antibody*, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) en dilució 1:2000. La quantificació de les bandes es va determinar utilitzant el programa ImageJ (National Institute of Health, NIH). El grau d'intensitat de cada banda es va determinar a partir de la suma dels valors de cada píxel dins d'una àrea fixada. La intensitat de fosforilació del residu S2808 de RyR2 es va normalitzar per la intensitat de RyR2, en cascuna de les condicions, mitjançant el programa Excel (Microsoft Corporation) per determinar el grau de fosforilació del residu S2808 del RyR2 WT.

2.11. Anàlisi estadística

Els resultats obtinguts en l'estudi funcional del canal RyR2 es van analitzar estadísticament mitjançant dos tipus de tests estadístics. Per

una banda, es va utilitzar una prova T-Student per analitzar les diferències entre els EC_{50} obtingudes en les anàlisis de sensibilitat a cafeïna i en l'anàlisi de l'activitat SOICR en condicions basals. I per una altra banda, es va utilitzar una ANOVA de dos factors per analitzar les diferències entre els punt de les corbes dosi-resposta de les anàlisis de sensibilitat a cafeïna, i de l'anàlisi d'activitat SOICR a diferents concentracions de forskolina. Aquest test també es va utilitzar per analitzar les diferències entre grups (WT, G357S, WT-Forskolina i G357S-Forskolina) en l'anàlisi de l'activitat SOICR en condicions mimètiques a estrès, en concret, es van analitzar les diferències en la freqüència de l'activitat SOICR a diferents concentracions de calci i les diferències en l'amplitud de les oscil·lacions de Ca^{2+} .

Un cop realitzats els corresponents tests estadístics, les diferències van ser considerades significatives quan el valor de p va ser inferior a 0.05 ($p < 0.05$).

3. Anàlisi de proteòmica del RyR2

3.1. Immunoprecipitació

Les cèl·lules HEK293_{RyR2} WT o G357S es van sembrar en plaques de petri de 100mm² i es van induir. Abans de la lisi cel·lular les cèl·lules es van incubar amb solució KRH 5µM de forskolina, durant 30'. Després de la incubació, les cèl·lules es van lissar amb tampó de lisis (**Taula 10**) suplementat amb inhibidors de fosfatases, 100nM Okadaic Acid (Cell Signaling Technology) i 20nM calyculin A (Cell Signaling Technology) i inhibidor de proteases (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA). El lisats cel·lulars es van recol·lectar, centrifugar, es va recuperar el sobrenedant (proteïnes) i es va guardar a -80°C.

Es van incubar 20 µg d'anticòs anti-RyR2 (*Mouse anti RyR2 monoclonal*, Affinity Bioreagents) amb 100µl de proteïna G-sepharosa (G-Healthcare) en 200 µl de tampó de lisis durant 1h, a 4°C, en agitació. Es van afegir 100 µl d'aquesta solució a les mostres de proteïnes guardades a -80°C, excepte al control negatiu (RyR2 WT sense anticòs) on només es va afegir tampó de lisis, i es va deixar incubar durant tota la nit a 4°C, en agitació. Les mostres es van centrifugar a 500g durant 5 minuts i es va eliminar el sobrenedant. Es van realitzar 3 rentats de la mostra, 2 amb tampó de lisis amb NP40 i amb tampó de lisis sense NP40. Les mostres es van diluir amb el tampó de càrrega *Loading Buffer 6X* (**Taula 10**), es

van escalfar a 70°C durant 10 minuts i es van centrifugar a 16000g durant 1'. Les proteïnes es van separar per electroforesis desnaturalitzant en un gel d'acrilamida al 6% amb SDS (**Taula 11**). El gel es va incubar durant una hora amb comassie blue *Gel Code Blue stain reagent* (Pierce) i es va rentar amb aigua MiliQ. Un cop identificada la proteïna RyR2 en les diferents mostres (**Figura 15**), es va tallar la banda per al corresponent anàlisi.

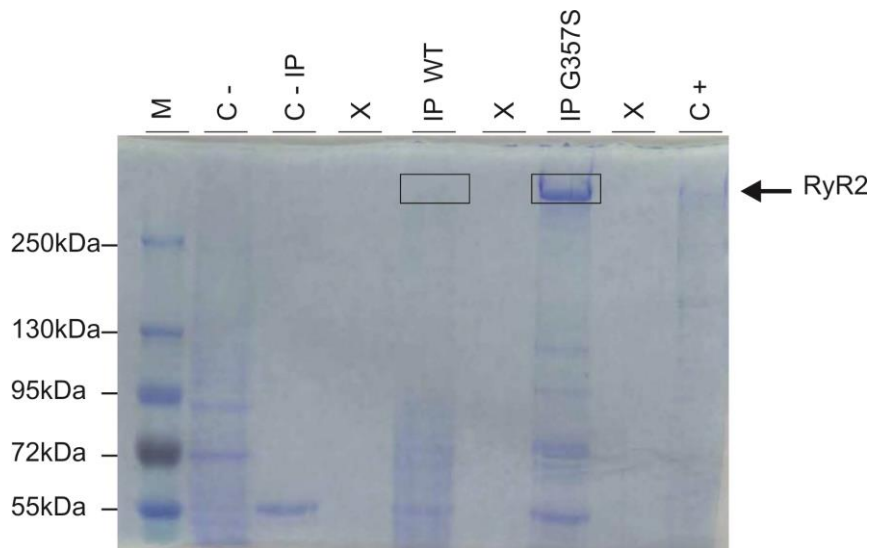


Figura 15. Gel de la immunoprecipitació de RyR2. Gel de la immunoprecipitació de RyR2 amb tinció comassie blue. A l'esquerra, pes molecular del marcador, i a la dreta, bandes corresponents a RyR2. A dalt, s'indica el què s'ha carregat a cadascun dels carrils. De esquerra a dreta, marcador de pes molecular, control negatiu (HEK293), control negatiu de la immunoprecipitació (sense anticòs), carril buit, immunoprecipitació de HEK293_{RyR2} WT, carril buit, immunoprecipitació de HEK293_{RyR2} G357S, carril buit i control positiu RyR2 WT purificat en gradient de sacarosa. Els requadres indiquen les mostres tallades per l'anàlisi d'espectrometria de masses.

3.2. Anàlisi de fosforilació per LC/MS-MS del canal RyR2

El kit *ProteoPrep Reduction and Alkylation Kit* (SIGMA) es va utilitzar per destenyir la banda purificada de RyR2, per reduir els ponts disulfur de les proteïnes i per alquilar-les. La banda purificada en gel d'acrilamida es va destenyir incubant la mostra dues vegades amb 200µl de bicarbonat amoni 200mM- 40% d'acetonitril durant 30' a 37°C. El gel es va assecar amb el SpeedVac durant 15'. La reducció dels ponts disulfur es va dur a terme amb solució tris[2-carboxyethyl]phosphine durant 1h, a 37 °C. L'alcalinització de la proteïna es va dur a terme incubant la mostra durant 1h amb iodoacetamida 40mM a 37°C. Es van fer tres rentats de la mostra, dues vegades amb solució de bicarbonat amoni 25mM i una vegada amb solució bicarbonat amoni 25mM i 50% d'acetonitril durant 15' a 37°C. El gel es va torna a assecar amb el SpeedVac durant 15'.

La proteïna es va digerir amb tripsina (Proteomics Grade Trypsin, SIGMA) durant tota la nit a 37°C, i es va purificar i concentrar amb el kit ZipTip® Pipette Tips (Millipore).

La mostra es va analitzar per espectrometria de masses amb *Ultraflex matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight* (MALDI-TOF, Bruker Daltonics) per identificar les proteïnes presents a la mostra. Es va diluir 1µl de mostra amb 0.5 µl de matriu (αcyano-4-hydroxycinnamic acid, 2/3 etanol, 1/3 acetat) en la placa de mostres del MALDI-TOF i es

va deixar assecar. Els espectres de masses (m/z 900-4000) es van adquirir en el mode de ions positius. L'anàlisi de les mostres es va dur a terme amb el programa FlexAnalysis v.2.0 (Baker Daltonics) i la identificació de les proteïnes amb el programa Proteome Discoverer (Thermo Scientific).

Un cop es va certificar que la proteïna purificada era RyR2 es va procedir a l'anàlisi de les modificacions post-traduccionals de la proteïna per espectrometria de masses en tàndem acoblada a un sistema de cromatografia en fase líquida (LC-MS/MS). Aquesta anàlisi es va dur a terme al Centre de Regulació Genòmica (CRG) de la Universitat de Barcelona. Els pèptids provinents de la tripsinització de RyR2 es van assecar i resuspendre en 150 μ l d'àcid fòrmic al 1%. Una alíquota de 2 μ l es va injectar al sistema LC-MS/MS (LTQ-Orbitrap). Es va utilitzar la cromatografia en fase líquida amb una columna C18 (75 μ m Øi, 10 cm, nano Acquity, 1.7 μ m BEH column) en aigua i gradient d'acetonitril del 1 al 40% durant 20 minuts i del 40 al 60% en 5 minuts, a una velocitat de flux de 250 nl/ min. Els pèptids eluïts es van ionitzar a 1.6-2.1kV. Les masses dels pèptids (m/z 350-1700) es van detectar amb el mode *Full Scan MS*. Els 10 pics més abundants es van fragmentar utilitzant heli com a gas de col·lisió amb un energia de col·lisió normalitzada del 38%, les dades es van adquirir utilitzant el programa Thermo Xcalibur (v.2.1.0.1140). La identificació de proteïnes es va dur a terme amb el

Proteome Discoverer (Thermo Scientific) i el cercador Sequest utilitzant la seqüència FASTA de RyR2 de ratolí. Un cop obtinguts els resultats, els pèptids tripsinitzats van tornar a ser digerits amb quimiotripsina per intentar augmentar la cobertura de la seqüència proteica i es van re-analitzar mitjançant LC-MS/MS, tal i com s'ha indicat anteriorment.

3.3. Assaigs de fosforilació *in vitro*

Els assaigs de fosforilació *in vitro* es van realitzar mitjançant pèptids sintètics de RyR2 WT GMGTSEIKYGDSICYIQH i RyR2 mutant (MT) GMGTSEIKYSDSICYIQH (canvi en la posició 357 d'una glicina a una serina) sintetitzats al Laboratori de Proteòmica i química de proteïnes de la Universitat Pompeu Fabra de Barcelona

Es van incubar 10 µg de cadascun dels pèptids sintètics amb 2.500 unitats de la subunitat catalítica de la PKA (New England Biolabs) amb 5µg d'ATP (Sigma) en un volum total de 20 µl, durant 3 hores, a 30°C. Les reaccions es van inactivar afegint àcid fòrmic a l'1%.

La formació d'espècies de pèptid fosforilat es va avaluar per espectrometria de masses MALDI-TOF. Es va diluir 1µl de mostra amb 0.5 µl de matriu (αcyano-4-hydroxycinnamic acid, 2/3 etanol, 1/3 acetat) en la placa de mostres del MALDI-TOF i es va deixar assecar. Els espectres de masses (m/z 900-4000) es van adquirir en el mode de ions positius. L'anàlisi de les mostres es va dur a terme amb el programa

FlexAnalysis v.2.0 (Baker Daltonics). La quantificació de la fosforilació es va realitzar dividint l'àrea sota els pic del pèptid fosforilat i l'àrea del pèptid no modificat.

La localització del lloc de fosforilació es va analitzar per LC-MS/MS al Centre de Regulació Genòmica de la Universitat Pompeu Fabra. Els pèptids es van assecar amb el *SpeedVac* durant 15' i es van resuspendre en 150 µl d'àcid fòrmic al 1%. Una alíquota de 2 µl es va injectar al sistema LC-MS/MS (LTQ-Orbitrap), les dades es van adquirir utilitzant el programa Thermo Xcalibur (v.2.1.0.1140). La identificació de proteïnes es va dur a terme amb el programa Proteome Discoverer (Thermo Scientific) i el cercador Sequest utilitzant la seqüència FASTA de RyR2 de ratolí.

IV.Resultats

IV. Resultats

1. Estudi genètic

En primer lloc, en el present treball ens hem proposat determinar la causa genètica de la CPVT que pateixen els membres afectats de la gran família de l'illa de Gran Canària. Per dur-ho a terme hem realitzat un estudi genètic dels principals gens associats a CPVT (*RyR2* i *CASQ2*) en el cas índex, nena de 14 anys que va patir una MSC després d'un estrès emocional (**Figura 16**). Un cop trobada la mutació, l'anàlisi genètic s'ha estès als familiars més propers i finalment a tota la família (**Figura 11**). Finalment, hem realitzat un estudi de lligament per certificar que el locus de la CPVT que presenten els membres de la família coincideix amb la regió on s'ha trobat la mutació.

Donat que el patrimoni genètic de cada individu juga un paper important en l'expressivitat i penetrància de la malaltia, hem analitzat la presència de variants rares i/o polimorfismes en les zones codificants dels principals gens associats a CPVT (*RyR2* i *CASQ2*) i de 55 gens associats MSC, en membres de la família que han patit MSC.

1.1. Estudi genètic de gens associats a CPVT en el cas índex

L'anàlisi genètic dels gens *RyR2* i *CASQ2* realitzat al cas índex (III.12, **Figura 16**) ha revelat la presència d'una mutació missense (mutació amb canvi de sentit) al exó 13 del *RyR2* (**Figura 17** i **Taula 14**). Es tracta d'una substitució d'una Guanina a una Adenina al nucleòtid 1069 de la seqüència codificant del gen *RyR2*, concretament, a la posició cromosòmica Chr1:237604682 (-Hg19-). Aquest canvi de nucleòtid produeix un canvi d'aminoàcid d'una Glicina a una Serina al residu 357 de la proteïna RyR2 (p.G357S_ *RyR2*, NP_001026.2). La mutació G357S no s'ha trobat a 290 controls sans (115 individus de les Illes Canàries i 175 individus del Canadà), ni tampoc ha estat descrita en població general segons les bases de dades internacionals dbSNP, *Exome Variant Server* i *1000 Genomes*. La mutació ha estat tractada com a variant nova, ja que, en el moment de la troballa no s'havia associat a cap malaltia. En l'actualitat, a part de en el present treball, la mutació G357S ha estat descrita en un cas aïllat de CPVT i en 3 individus amb CPVT d'una mateixa família.^{34,118}

En el cas índex, a més de la mutació G357S del *RyR2*, s'han identificat 6 variats genètiques a la zona codificant del *RyR2* i 2 variants a la zona codificant del gen *CASQ2*, descrites en població general. Totes elles són polimorfismes, ja que, presenten una freqüència al·lèlica de l'al·lel

minoritari (MAF) superior a 0.01. Aquestes variants es descriuen a la **Taula 14**.

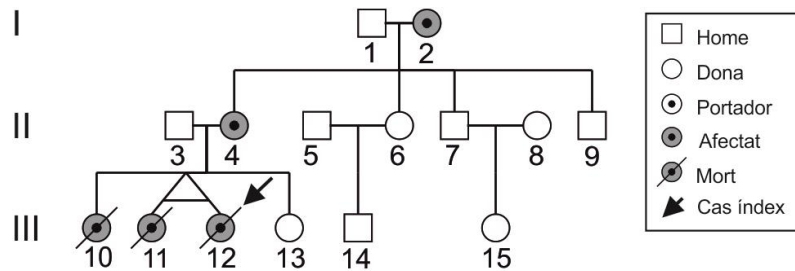


Figura 16. Pedigrí de família del cas índex. El pedigrí representa la família del cas índex, en la que 3 germanes han patit MSC durant exercici o emoció. La fletxa indica el cas índex, nena de 14 anys i l'última de les germanes que va patir MSC.

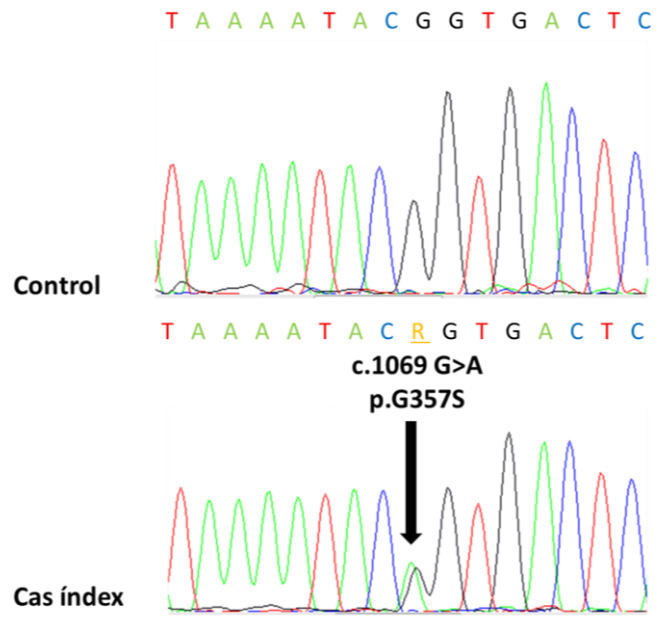


Figura 17. Electroferograma de la mutació G357S. A dalt, es mostra l'electroferograma del pacient control, a baix, l'electroferograma del cas índex, on es mostra el canvi de nucleòtid a la posició 1069 d'una Guanina a una Adenina.

Taula 14. Variants trobades al cas índex dels gens RyR2 i CASQ2

Variant	Gen	Posició cromosòmica	Nucleòtid	MAF*
G357S	<i>RyR2</i>	Chr1:237604682	G/A	-
rs2253273	<i>RyR2</i>	Chr 1:237711797	A/G	0.17 (A)
rs707189	<i>RyR2</i>	Chr 1:237801770	T/C	0.04 (T)
rs684923	<i>RyR2</i>	Chr 1:237814783	C/T	0.45 (C)
rs2797436	<i>RyR2</i>	Chr 1:237863718	T/G	0.03 (T)
rs2797441	<i>RyR2</i>	Chr 1:237881770	T/C	0.03 (C)
rs2685301	<i>RyR2</i>	Chr 1:237890437	C/T	0.03 (C)
rs4074537	<i>CASQ2</i>	Chr 1:116311198	C/T	0.03 (T)
rs7413162	<i>CASQ2</i>	Chr 1:116243877	G/A	0.42 (A)

*Freqüència al·lèlica de l'al·lel minoritari

La predicció bioinformàtica sobre la patogenicitat de la mutació s'ha realitzat amb tres eines bioinformàtiques diferents, totes tres prediuen que la mutació és potencialment patogènica. El programa de predicció PoliPhen-2 prediu que la mutació G357S és probablement patogènica amb una puntuació de 1. I els programes de predicció Condel i Provean prediuen que la mutació és deletèria amb una puntuació de 0.845 i 4.458, respectivament, Materials i mètodes (pàg.101).

Un cop identificada la mutació en el cas índex, s'ha realitzat l'estudi genètic dels familiars més propers (**Figura 16**). La mutació G357S s'ha identificat en l'àvia i en la mare de 77 i 53 anys (I.2 i II.4, **Figura 16**), que en el moment de la realització de l'estudi genètic no havien manifestat símptomes de la malaltia. La consegüent prova d'esforç, realitzada després de l'estudi genètic, ha demostrat la presència d'arítmies ventriculars, durant exercici, tant en la mare, com en l'àvia del cas índex, de manera que han estat diagnosticades amb CPVT. Gràcies a la conservació de l'ADN de les dues germanes de 10 i 14 anys (II.1 i II.2, **Figura 16**), mortes durant estrès físic, s'ha pogut dur a terme l'estudi genètic de les dues mostres. Aquestes estudi conclou que aquestes dues germanes també eren portadores de la mutació G357S al gen *RyR2*.

1.2. Test genètic en cascada dels familiars

Un cop trobada la mutació al cas índex i en els familiars més propers, s'ha realitzat l'estudi genètic en cascada de tots els possibles portadors de la mutació G357S de la gran família (**Figura 11**). L'estudi genètic de l'exó 13 del *RyR2* s'ha realitzat en un total de 1445 mostres. La mutació G357S s'ha identificat en un total de 208 mostres, 199 de les quals corresponen a portadors vius de la mutació. L'estudi genètic s'ha pogut realitzar en 6 familiars morts en circumstàncies d'estrès emocional o físic dels quals es disposava de l'ADN. Tots 6 han resultat ser portadors de la mutació G357S. Alguns membres de la família van rebutjar fer-se l'estudi

genètic i 3 d'aquest membres han patit MSC. L'anàlisi genètica, realitzada a posteriori, ha revelat la presència de la mutació G357S al *RyR2* en aquest tres individus.

La mutació s'ha trobat en heterozigosi en un total de 206 pacients i en homozigosi en 2 pacients.

1.3. Anàlisi de lligament de la regió cromosòmica 1q41-1q44

Per certificar que el locus de la CPVT en aquesta família correspon a la regió de la mutació G357S, hem realitzat un estudi de lligament en dos nuclis de la gran família (**Figura 18**). En l'estudi de lligament s'han inclòs un total de 23 individus, 12 afectats (4 morts durant exercici i/o emoció i 8 diagnosticats amb CPVT per la presència d'arítmies ventriculars a la prova d'esforç), 9 no afectats i 2 de fenotip desconegut.

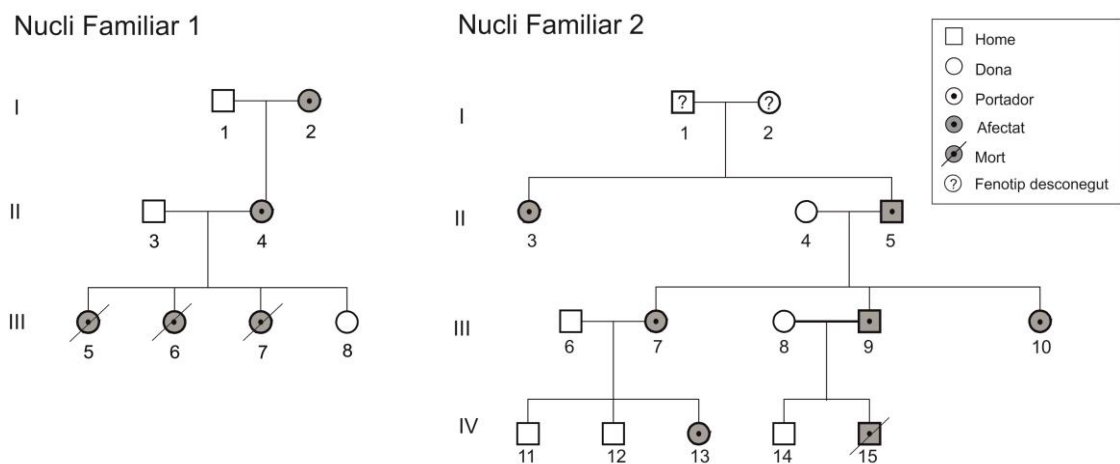


Figura 18. Famílies incloses a l'estudi de lligament. Pedigrís dels dos nuclis familiars que pertanyen a la gran família de les Illes Canàries que s'han utilitzat a l'estudi de lligament.

En primer lloc, hem determinat el genotip per cada individu dels marcadors D1S103, D1S459, D1S163, D1S1567, D1S2785, D1S2679. La **Figura 19** mostra els haplotips pels 6 marcadors en els dos nuclis familiars i la posició de les recombinacions, que permetran localitzar la regió responsable de la malaltia. En el nucli familiar 1, no s'observen recombinacions en la regió cromosòmica que cosegrega amb el locus de la malaltia (regió cromosòmica rosa), mentre que en el nucli familiar 2 sí s'observa recombinació en aquesta regió cromosòmica (regió cromosòmica groga). A l'individu III: 9 del nucli 2, s'observa recombinació entre l'al·lel causant de la malaltia i el marcador D1S2679. I a l'individu IV:13 del nucli 2, s'observa recombinació entre el marcador D1S163 i l'al·lel causant de la malaltia. Aquest resultat ens indiquen que l'al·lel causant de la malaltia es pot trobar en la regió cromosòmica compresa entre els marcadors D1S163 (276.637cM) i el D1S2679 (294.602cM).

Nucli Familiar 1

Nucli Familiar 2

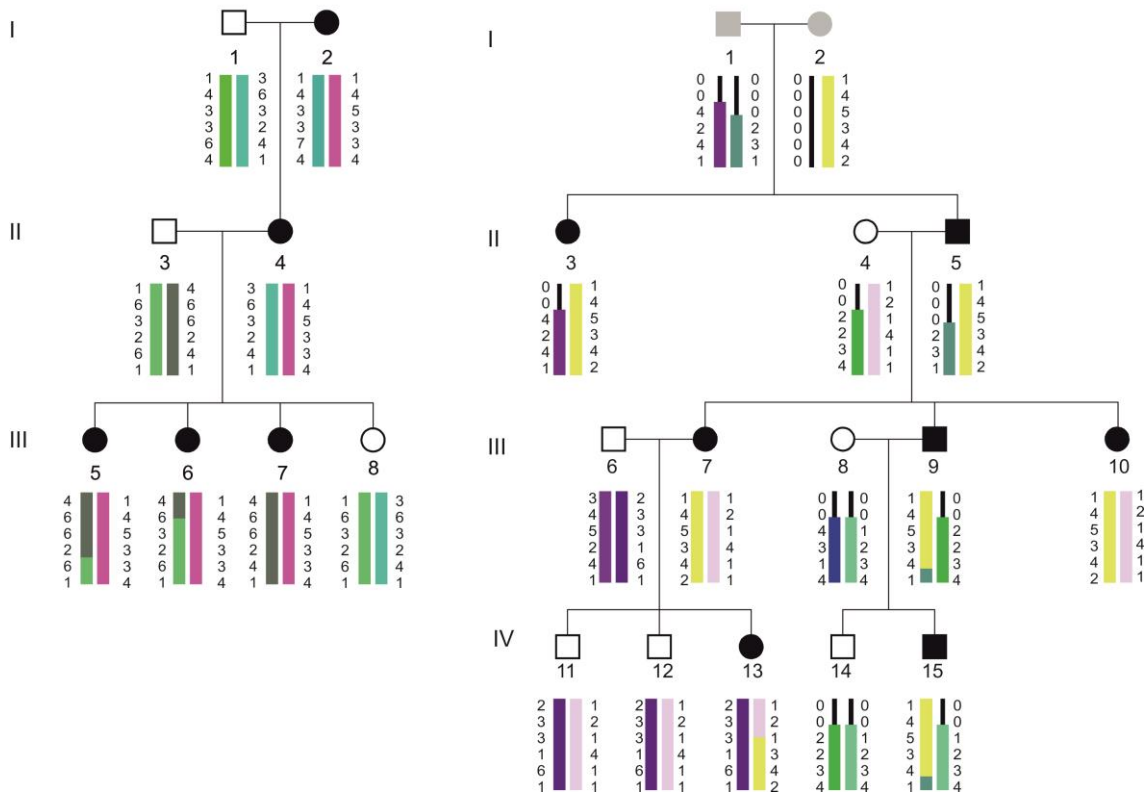


Figura 19. Haplotips i recombinacions als dos nuclis familiars. Els al·lels es mostren en números del 1 al 6 pels diferents marcadors en el següent ordre: D1S103, D1S459, D1S163, D1S1567, D1S2785, D1S2679. El número 0 indica que no hi ha dades disponibles del marcador per aquell individu. En el nucli 1, la regió cromosòmica de color rosa és la regió que cosegrega amb el locus de la malaltia, mentre que, en el nucli dos, ho és la groga. Els cercles representen dones, els quadrats homes i els símbols pintats representen individus afectats.

Per confirmar o descartar el locus de la malaltia hem realitzat l'anàlisi de lligament en els dos nuclis familiars. Les puntuacions LOD score per a cada una de les posicions es representen a la **Taula 15** i a la **Figura 20**. El LOD score per als marcadors D1S103 (266.8cM), D1S459 (271.2cM), D1S163 (276.6cM), D1S2679 (294.6cM) és inferior a 3, de manera que

no podem confirmar ni descartar lligament entre aquests marcadors. Mentre que, el LOD score per als marcadors D1S567 (281.2cM) i D1S2785 (288.3cM) és igual a 3, cosa que indica que existeix lligament genètic entre ells i el locus de la CPVT en aquesta família.

Els resultats de l'estudi de lligament indiquen que el locus causant de la malaltia es troba en la regió compresa entre els marcadors D1S567 (Chr1:237414187-237414519pb) i el marcador D1S2785 (Chr1:240876770-240876947pb), posicions entre les quals es troba el *RyR2* i la mutació G357S (Chr1:237604682) en els individus afectats.

Taula 15. Lod score dels marcadors STR's inclosos a l'estudi de lligament.

Cromosoma	Posició (cM)	Marcador	Model	LOD score
1	266.8	D1S103	Model dominant	1.3
1	271.2	D1S459	Model dominant	-1.2
1	276.6	D1S163	Model dominant	-1.1
1	281.2	D1S567	Model dominant	3.0
1	288.3	D1S2785	Model dominant	3.0
1	294.6	D1S2679	Model dominant	-1.1

Anàlisi de lligament

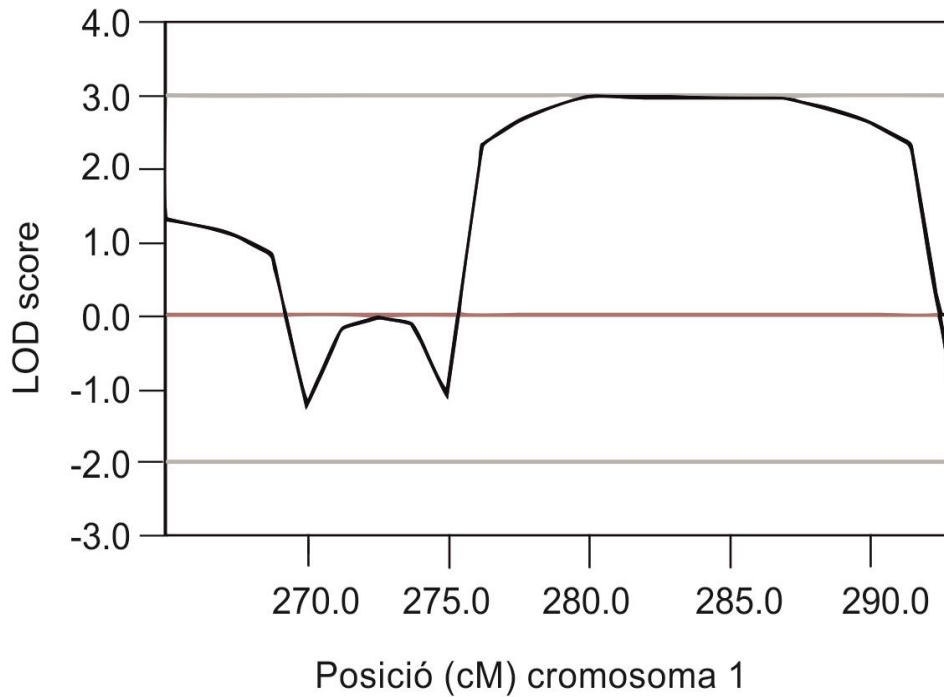


Figura 20. Lod score dels marcadors STR's inclosos a l'estudi de lligament.

Lod score obtingut per a cada una de les posicions del cromosoma 1 estudiades mitjançant els marcadors STR D1S103 (266.8 cM), D1S459 (271.2 cM), D1S163 (276.6 cM) D1S567 (281.2 cM) i D1S2785 (288.3 cM) i D1S2679 (294.6cM) per l'estudi de lligament. Es pot observar com el LOD score arriba a 3 entre 281.2cM i 288.3cM, regió en la qual existeix lligament genètic.

1.4. Estudi de polimorfismes dels gens *RyR2* i *CASQ2* entre pacients afectats

Per descartar la presència de polimorfisme o variants rares (MAF <0.01) en la regió codificant del gens *RyR2* i *CASQ2*, que puguin tenir un efecte modulador de la mutació G357S i que repercuteixi en l'expressivitat i penetrància de la malaltia, s'ha realitzat una anàlisi de polimorfismes dels gens *RyR2* i *CASQ2* en dos víctimes de MSC de la família (un d'ells, el cas índex). Els resultats s'han comparat entre si i amb un familiar no afectat.

Els resultats d'aquesta anàlisi es poden observar a la **Taula 16**. L'única variant, en regió codificant, compartida entre els membres afectats és la mutació G357S del *RyR2*. Totes les altres variants compartides es troben en regions no codificants (introns). En el gen *CASQ2* no s'ha trobat cap polimorfisme compartit entre els afectats.

Així doncs, en les regions codificants dels principals gens associats a CPVT, no existeix cap polimorfisme, ni variant rara, que puguin modular l'efecte de la mutació G357S.

Taula 16. Variants compartides entre afectats al gen RyR2

Variant	Gen	Regió	Posició cromosòmica	Nucleòtid	MAF
rs10925391	RyR2	Intró	Chr 1:237540615	A/C	0.39 (C)
rs16835237	RyR2	Intró	Chr 1:237586384	T/C	0.16 (C)
G357S	RyR2	Exó 13	Chr 1:237604682	G/A	-
rs2779365	RyR2	Intró	Chr 1:237693921	A/G	0.20 (A)
rs530109	RyR2	Intró	Chr 1:237802559	T/C	< 0.01 (T)
rs790889	RyR2	Intró	Chr1:237946964	T/C	0.43 (C)
rs2256242	RyR2	Intró	Chr :237951451	A/G	0.38 (A)
rs790901	RyR2	Intró	Chr 1:237957161	A/G	0.25 (A)
rs790902	RyR2	Intró	Chr 1:237957146	G/A	0.27 (G)
rs790900	RyR2	Intró	Chr 1:237957309	A/C	0.26 (A)
rs790879	RyR2	Intró	Chr 1:237969638	A/G	0.29 (G)

1.5. Estudi genètic de 55 gens associats a MSC en el cas índex

Un cop hem descartat la presència d'altres variants a les regions codificants dels principals gens associats a CPVT, i per descartar la presència d'altres mutacions o variants rares en altres gens associats a MSC, ens hem proposat analitzar genèticament els 55 gens de la **Taula 6** mitjançant NGS.

L'estudi dels 55 gens s'ha dut a terme en el cas índex mitjançant el sistema d'ultraseqüenciació basat en el sistema MiSeq (Illumina). Un cop analitzat els 55 gens i filtrades totes les variants trobades pels criteris anomenats a la secció Materials i mètodes (pàg.99), l'única mutació que s'ha trobat en el cas índex és la variant G357S del RyR2. De manera que, podem descartar l'existència d'altres mutacions o variants rares en gens associats a MSC en el cas índex, que puguin modular l'efecte de la mutació.

En conjunt, tots els resultats obtinguts en l'estudi genètic d'aquesta família, indiquen que la causa de la CPVT és la mutació G357S del *RyR2*, i que no existeixen polimorfismes ni variants rares, que puguin modular l'efecte de la mutació G357S, en les regions codificants dels principals gens associats a CPVT i a MSC.

2. Estudi de la funció del canal RyR2

Un cop identificada la causa genètica de la CPVT en la gran família de les Illes Canàries, ens hem proposat estudiar els mecanismes de patogenicitat de la mutació G357S del *RyR2*. Per dur-ho a terme hem utilitzat línies cel·lulars estables de HEK293_{RyR2} que expressen de manera induïble el canal RyR2 WT i RyR2 G357S. Després de determinar la correcta expressió de la proteïna en els nostres cultius cel·lulars (**Figura 12** i **Figura 13**) hem analitzat els canvis funcionals que produeix la mutació G357S al canal RyR2. Per una banda, hem estudiat la funcionalitat del canal RyR2 G357S en condicions basals i, per l'altra, en condicions mimètiques estrès β -adrenèrgic, en presència de forskolina (i.e., activitat de l'adenilat ciclasa augmentada).

2.1. Estudi de la funció del canal en condicions basals

2.1.1. Conductància del canal RyR2 G357S

Estudis funcionals realitzats pel grup de Guo Guang Du i col. al 2001, mostren l'existència de mutacions que no modifiquen la sensibilitat del canal per la cafeïna, però modifiquen característiques biofísiques del canal com la seva conductància unitària.¹¹⁹ Per tal de determinar si la mutació G357S produeix canvis en aquestes característiques del canal RyR2, hem realitzat experiments de canals únics incorporats en bicapes lipídiques artificials. Per dur-ho a terme, hem purificat el canal a partir

d'un gradient continu de sacarosa i hem determinat en quina fracció es troba el RyR2 mitjançant Dot Blot, Materials i mètodes (Pàg. 113 i 114). Posteriorment, l'hem reconstituït en bicapes lipídiques artificials i hem registrar l'activitat del canal RyR2 G357S com s'explica a l'apartat de Materials i mètodes (pàg. 116). Un cop incorporat el canal RyR2 G357S a la bicapa, hem analitzat la seva activitat a diferents voltatges (V) i hem determinar l'amplitud de cada esdeveniments (I) per realitzar la corba IV (corrent-voltatge). Els registres s'han dut a terme en condicions simètriques de K^+ (250mM /250mM) i a 100 μ M de Ca^{2+} . A la **Figura 21** es mostra l'activitat d'un canal únic (RyR2_{G357S}), registrada durant un protocol de polsos de -80mV a 80mV, amb increments de 20mV. La corresponent corba IV es veu representada a la **Figura 22**. L'anàlisi de la pendent de la corba mostra que la conductància unitària del canal RyR2 G357S és 785pS, molt similar a la descrita al 2001 per Guo Guang Du i col. pel RyR2 WT (798pS), en les mateixes condicions de registre.¹¹⁹ Malauradament, la taxa d'incorporació de canals únics a la bicapa lipídica, ens els nostres experiments, ha estat molt baixa, i no hem pogut mesurar la conductància unitària del canal RyR2_{WT}, ni altres característiques del canal RyR2_{G357S}, com la Po. Tot i això, si comparem els resultats obtinguts amb la bibliografia, els resultats indiquen que la mutació G357S no modifica la conductància unitària del canal.

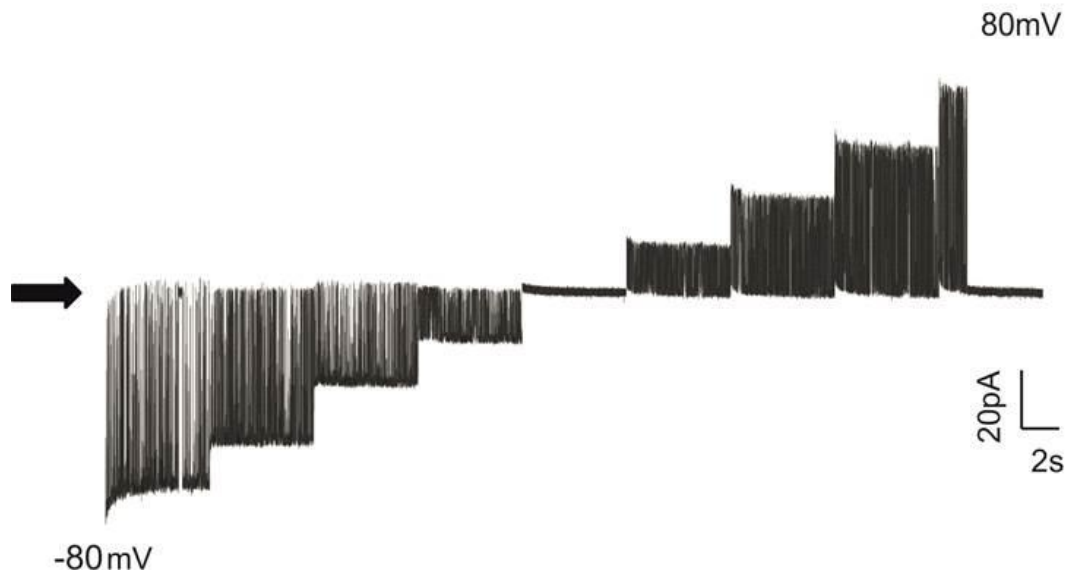


Figura 21. Registre de canals únics RyR2 G357S. Registres de canal únic on es mostra l'activitat del canal RyR2_{G357S} a diferents voltatges, de -80mV a 80mV, amb increments de 20mV. La fletxa indica l'estat tancat del canal.

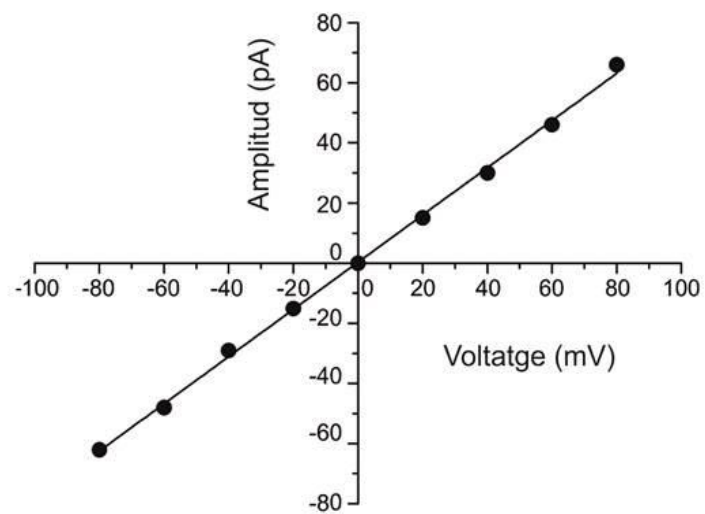


Figura 22. Corba IV del canal RyR2 G357S. Corba IV obtinguda a partir de l'anàlisi de registres de canal únic del RyR2 G357S, la corba s'ha ajustat a una funció lineal $f(y)=ax+b$, on a és la pendent de la corba (0.785) i b és el punt de tall de la corba amb l'eix y (0).

2.1.2. Anàlisi de sensibilitat a cafeïna

La cafeïna s'utilitza habitualment com a agonista del RyR2 per induir la sortida de Ca^{2+} del reticle, ja que, redueix el llindar d'activació del canal pel Ca^{2+} intraluminal.⁷¹ Donat que un gran nombre de mutacions associades a CPVT modifiquen la sensibilitat del canal per la cafeïna, ens hem proposat determinar si la mutació G357S modifica la sensibilitat a cafeïna del RyR2.^{95,97,104,120} Per dur-ho a terme, hem analitzat les oscil·lacions de Ca^{2+} induïdes per diferents concentracions d'aquest agonista en cèl·lules HEK293_{RyR2} WT o G357S carregant les cèl·lules amb l'indicador de Ca^{2+} fluorescent fluo-4AM i mitjançant la perfusió local de diferents concentracions de cafeïna (0.1mM, 0.25mM, 0.5mM, 1mM, 2mM, 5mM, 10mM, 20mM), Materials i mètodes (pàg.119). A la **Figura 23**, es poden observar imatges de les respostes d'ambdues poblacions cel·lulars a diferents concentracions de cafeïna. A mesura que s'incrementa la concentració de cafeïna, s'observa un major nombre de cèl·lules amb oscil·lacions de Ca^{2+} .

Aquest efecte també es pot observar a la **Figura 24**, on es veuen representats els traços de fluorescència i les oscil·lacions de Ca^{2+} induïdes per les diferents concentracions de cafeïna, tan en les cèl·lules que expressen RyR2 WT, com en les cèl·lules que expressen RyR2 G357S. En aquesta figura, es pot observar que la resposta a cafeïna

d'ambdós cultius cel·lulars és visible a 0.1mM de cafeïna, i que els dos cultius cel·lulars saturen la seva resposta a 2mM de cafeïna.

A partir d'aquesta sèrie experimental s'han construït les corbes dosi-resposta representades a la **Figura 25**. Aquestes s'han obtingut a partir de 17 experiments, en cèl·lules que expressen RyR2 WT, i 15 experiment, en cèl·lules que expressen RyR2 G357S. Les corbes s'han construït representant la fluorescència màxima del transient de Ca^{2+} respecte la concentració de cafeïna. Tal i com es mostra a la figura, no s'observa un desplaçament entre ambdues corbes dosi-resposta. La EC_{50} és de $0.16mM \pm 0.08$ per RyR2 WT i de 0.21 ± 0.04 mM per RyR2 G357S. Així doncs, no s'observen diferències significatives ($p > 0.05$) entre les EC_{50} d'ambdues poblacions cel·lulars, en resposta a cafeïna.

Així doncs, a diferència d'altres mutacions, aquests resultats indiquen que la mutació G357S no modifica la sensibilitat a cafeïna del canal RyR2 en condicions basals.

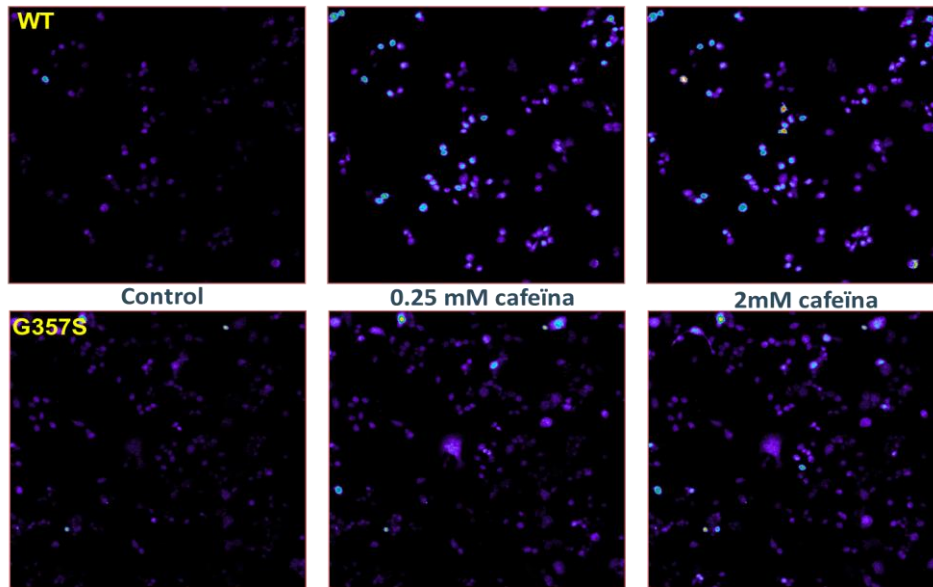


Figura 23. Imatges representatives de fluorescència de Ca^{2+} en resposta a la cafeïna. A dalt s'observen cèl·lules HEK293_{RyR2} amb RyR2 WT, carregades amb Fluo 4-AM, en solució control i amb diferents concentracions de cafeïna (0.25 mM i 2mM), a sota, el mateix per les HEK293_{RyR2} amb RyR2 G357S. El color blau lilós representa una major intensitat de fluorescència per l'alliberació de Ca^{2+} al citoplasma de les cèl·lules.

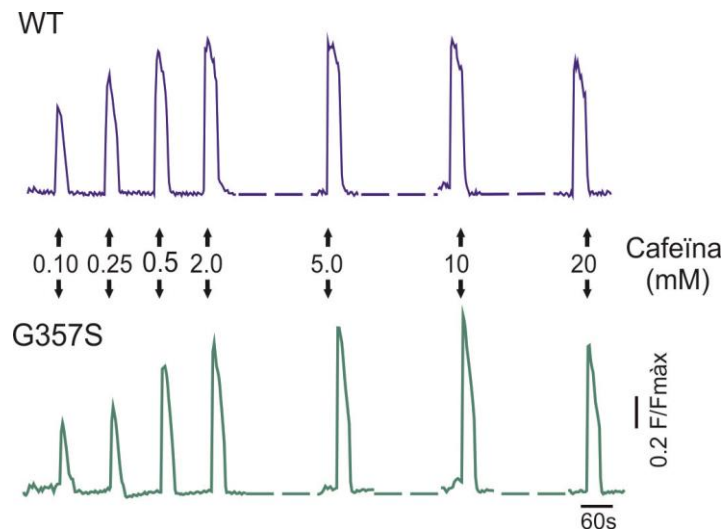


Figura 24. Traços de fluorescència representatius de les oscil·lacions de Ca^{2+} induïdes per cafeïna. Les fletxes indiquen les diferents concentracions de cafeïna (0.1mM, 0.25mM, 0.5mM, 1mM, 2mM, 5mM, 10mM, 20mM) perfundida localment que produeixen les oscil·lacions de Ca^{2+} en cèl·lules HEK293_{RyR2} que expressen el canal WT (a dalt) o el canal amb la mutació G357S (a baix).

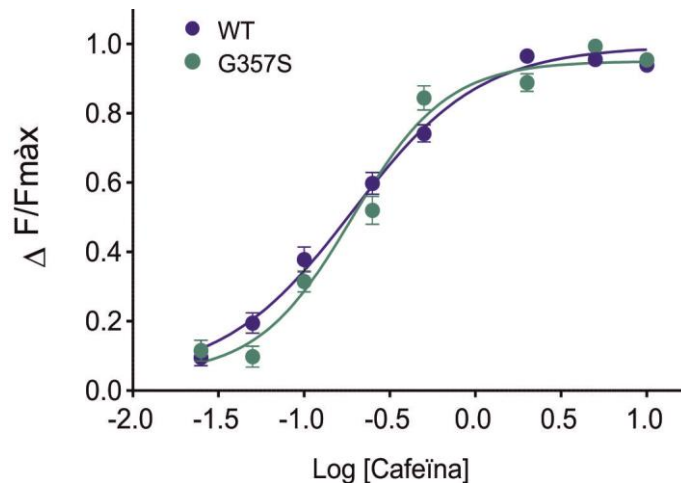


Figura 25. Corbes dosi-resposta a cafeïna. Resposta a cafeïna de cèl·lules HEK293_{RyR2} que expressen el canal WT (blau) o que expressen el canal RyR2 G357S (verd). L'amplitud de les diferents oscil·lacions de Ca²⁺ (ΔF/Fmàx.) estan normalitzats per la resposta màxima i es veuen representats com a funció del logaritme de les diferents concentracions de cafeïna (mM). El conjunt de dades (n_{WT}=17 ; n_{G357S}=15) s'han aproximat a un model dosi resposta amb la funció $Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{-(\text{Log EC}_{50} - X) \cdot \text{HillSlope}})$.

2.1.3. Anàlisi de l'activitat SOICR

Tal i com s'ha esmentat amb antelació, un gran nombre de mutacions al RyR2 alteren la sensibilitat del canal pel Ca²⁺ intraluminal i provoquen un augment en l'activitat SOICR, que pot acabar produint DADs durant la diàtole.²⁰ Així doncs, en el present apartat ens hem proposat avaluar si la mutació G357S altera la sensibilitat del canal pel Ca²⁺ intraluminal, analitzant l'activitat SOICR de les cèl·lules HEK293_{RyR2} WT i G357S. Per induir la sobrecàrrega de Ca²⁺ del reticle, hem incubat les cèl·lules amb concentracions creixents de Ca²⁺ extracel·lular (0.05mM, 0.1mM, 0.2mM, 0.3mM, 0.5mM, 0.75mM i 1mM) durant 30 minuts, Materials i mètodes (pàg.121). L'augment de la concentració de Ca²⁺ en el medi

extracel·lular, disminueix la sortida de Ca^{2+} de l'interior de la cèl·lula a través de NCX, de manera que, s'acaba produint un augment en concentració de Ca^{2+} a l'interior del reticle.¹²¹ Així doncs, l'augment del Ca^{2+} extracel·lular pot induir la sobrecàrrega de Ca^{2+} del reticle que, quan arriba a un cert llindar, activa el RyR2 i produeix el SOICR.^{121,122}

En aquests experiments, les cèl·lules amb activitat SOICR s'han seleccionat com a regions d'interès, i s'han obtingut els traços de fluorescència temporals representats a la **Figura 26**. En aquests traços, les oscil·lacions de Ca^{2+} s'observen com a pics espontanis de fluorescència i reflecteixen que, com major és la concentració de Ca^{2+} extracel·lular, més cèl·lules presenten activitat SOICR, i més oscil·lacions de Ca^{2+} es produeixen en cada una d'aquestes cèl·lules. Aquest fet queda reflectit en les corbes dosi-resposta de la **Figura 27** i és conseqüència de que a major concentració de Ca^{2+} , més fàcil és arribar al llindar perquè es produeixi el SOICR.

Les corbes dosi-resposta de la **Figura 27** s'han obtingut a partir de l'anàlisi del nombre d'oscil·lacions espontànies de Ca^{2+} per cèl·lula, a cada concentració de Ca^{2+} . Aquesta anàlisi reflecteix com augmenta la freqüència de l'activitat SOICR, en concentracions creixents de Ca^{2+} extracel·lular, en ambdós cultius cel·lulars. Tal i com mostra la figura, no s'observa cap desplaçament significatiu entre les corbes dosi resposta de les cèl·lules HEK293_{RyR2} WT i G357S, ni tampoc s'observen diferències

significatives ($p > 0.05$) entre les EC_{50} , en resposta a Ca^{2+} , de les cèl·lules que expressen RyR2 WT (0.74 ± 0.03 mM) i les que expressen RyR2 G357S (0.71 ± 0.03 mM).

Aquests resultats indiquen que, en aquestes condicions, no existeixen diferències significatives pel que fa a l'activitat SOICR d'ambdós cultius cel·lulars. Fet que suggereix que la mutació G357S, en condicions basals, no modifica la sensibilitat del canal pel Ca^{2+} intraluminal.

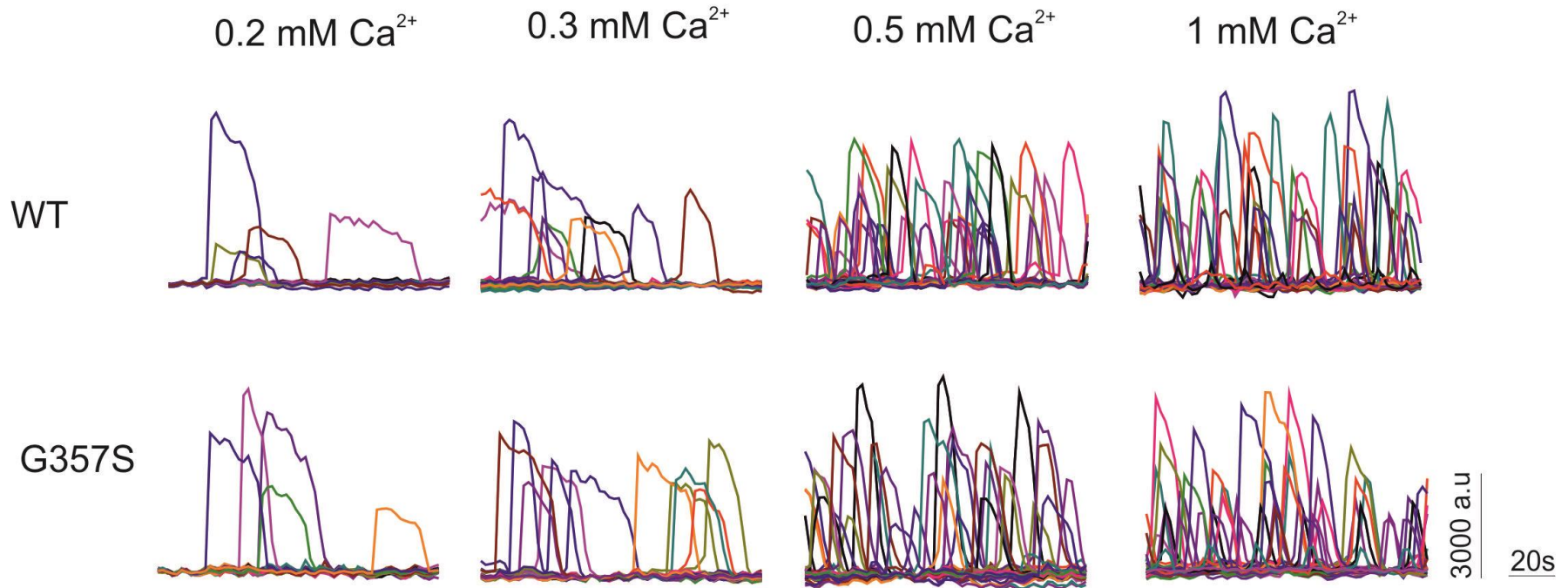


Figura 26. Traços de fluorescència i activitat SOICR en cèl·lules HEK_{RyR2} WT i G357S. A d'alt, es mostren els traços de fluorescència en HEK_{RyR2} WT, i a baix, en cèl·lules HEK_{RyR2} G357S. De esquerra a dreta, les diferents concentracions de Ca²⁺. Cada línia de color indica una cèl·lula diferent i els pics de fluorescència representen la sortida espontània de Ca²⁺ del reticle.

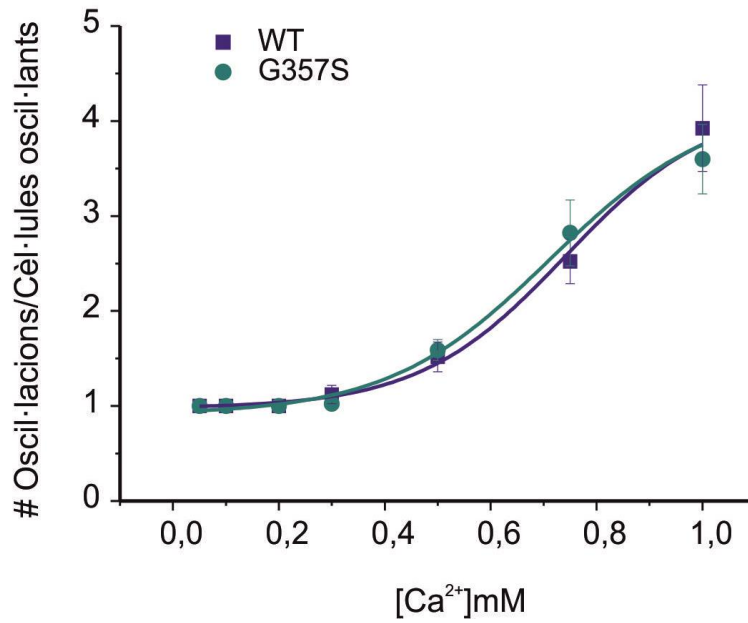


Figura 27. Corbes dosi-resposta de l'activitat SOICR en cèl·lules HEK_{RyR2} WT i G357S. Corbes dosi-resposta del nombre d'oscil·lacions respecte les cèl·lules oscil·lants (activitat SOICR) a diferents concentracions de Ca²⁺. En blau corbes dosi-resposta de les HEK_{RyR2} WT i en verd de les HEK_{RyR2} RyR2 G357S (n_{WT} =6 ; n_{G357S}=6). Les corbes dosi resposta s'han ajustat a la funció $(y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((\text{LOG}x0-x)^*p)}))$.

2.2. Estudi de la funció del canal en condicions mimètiques a estrès β -adrenèrgic.

Els resultats obtinguts fins al moment, mostren que la mutació G357S del RyR2 no produeix cap canvi ni en la sensibilitat del canal per cafeïna, ni en la conductància unitària, ni en l'activitat SOICR del canal. Tal i com s'ha esmentat a la introducció, les arítmies en CPVT es produeixen, principalment, durant l'estimulació dels receptors β adrenèrgics dels miòcits cardíacs, com a conseqüència d'una descàrrega de catecolamines durant un estrès emocional o físic. Els estudis funcionals de la mutació G357S, que hem presentat fins al moment, han estat realitzats en condicions basals, és a dir, sense l'estimulació d'aquesta via. Així doncs, ens hem proposat analitzar les propietats funcionals del canal RyR2 WT i G357S, expressat en cèl·lules HEK293_{RyR2}, en condicions que mimetitzen l'estimulació dels receptors β adrenèrgics. Per dur-ho a terme hem utilitzat forskolina, compost que activa l'enzim adenilat ciclasa i augmenta els nivell de AMP cíclic en les cèl·lules. De manera similar al que succeeix durant l'estimulació dels receptors β adrenèrgics dels miòcits cardíacs, l'augment de AMP cíclic produeix l'activació de la PKA que fosforila diferents dianes de l'acoblament E-C, entre elles, el RyR2.

Així doncs, en primer lloc, ens hem proposat determinar quin és l'efecte de la forskolina en els cultius de cèl·lules HEK293_{RyR2}. Per una banda,

hem volgut determinar si la Serina 2808 del RyR2, que és forforilada per la PKA durant l'estimulació dels receptors β adrenèrgics, es fosforila en presència de forskolina, i per l'altra, si la presència de forskolina modifica l'activitat SOICR del canal, com a conseqüència de l'augment de sensibilitat del RyR2 pel Ca^{2+} intraluminal quan el canal està fosforilat.

En segon lloc, i un cop hem determinat que l'efecte de la forskolina és el desitjat, hem analitzat la sensibilitat a cafeïna del canal i l'activitat SOICR de les HEK293_{RyR2} WT i G357S en presència de forskolina, és a dir, en condicions mimètiques a l'estimulació de la via β adrenèrgica.

2.2.1. Acció de la forskolina en cèl·lules HEK293_{RyR2}

2.2.1.1. Fosforilació de la Serina 2808 del RyR2 per efecte de la forskolina

Es coneix que la serina 2808 (S2808) augmenta el nivell de fosforilació durant l'estimulació β adrenèrgica, com a conseqüència de l'activació de la PKA.¹²³ Per determinar si l'acció de la forskolina acaba produint la fosforilació del residu S2808 en els nostres cultius cel·lulars, hem analitzat el nivell de fosforilació d'aquest residu en el RyR2 WT de les HEK_{RyR2} tractades amb forskolina. Per analitzar el nivell de fosforilació, s'ha realitzat la tècnica de western blot amb anticossos contra la serina 2808 fosforilada (S2808F) del RyR2 i contra la proteïna RyR2. Aquesta tècnica s'ha realitzat en lisats de cèl·lules tractades amb diferents

concentracions de forskolina (0 μ M, 1 μ M i 5 μ M) que expressen el RyR2 WT, Materials i mètodes (pàg.122).

Els resultats obtinguts per western blot es mostren a **Figura 28**, a l'esquerra s'observen, per les diferents concentracions de forskolina, les bandes de RyR2 i, a la dreta, les bandes contra la S2808F. Per determinar el nivell de fosforilació, les bandes corresponents a la S2808F (dreta) s'han normalitzat pel total de RyR2 detectat (esquerra). Aquests resultats es mostren a la **Figura 29**, on es pot observar que la S2808 mostra un nivell basal de fosforilació abans del tractament amb forskolina, segurament, com a conseqüència de que també pot ser fosforilada per la CAMKII. Tot i aquest nivell basal de fosforilació, el tractament amb forskolina produeix l'augment de la fosforilació de la S2808, a més concentració de forskolina, més alt és el nivell de fosforilació del residu, que arriba gairebé a saturar-se a 5 μ M de forskolina.

Així doncs, en els cultius cel·lulars de HEK293_{RyR2} la presència de forskolina acaba produint la fosforilació de la S2808, mimetitzant el que succeeix durant l'estimulació dels receptors β adrenèrgics en els miòcits cardíacs.

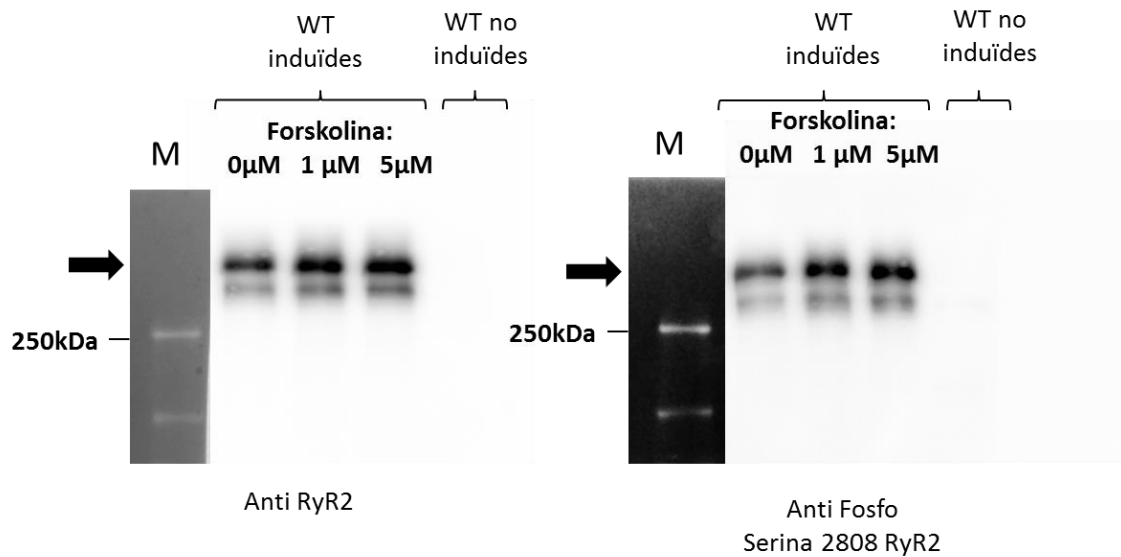


Figura 28. Detecció per western blot de la proteïna RyR2 i fosforilació de la S2808. A l'esquerra, bandes de RyR2 obtingudes en els lisats cel·lulars que expressen RyR2 WT de cèl·lules tractades amb 0 μM, 1 μM i 5 μM de forskolina. A la dreta, bandes de S2808 de RyR2 fosforilada en les mateixes mostres. A la dreta, control negatiu de cèl·lules no induïdes. M, marcador de pes molecular.

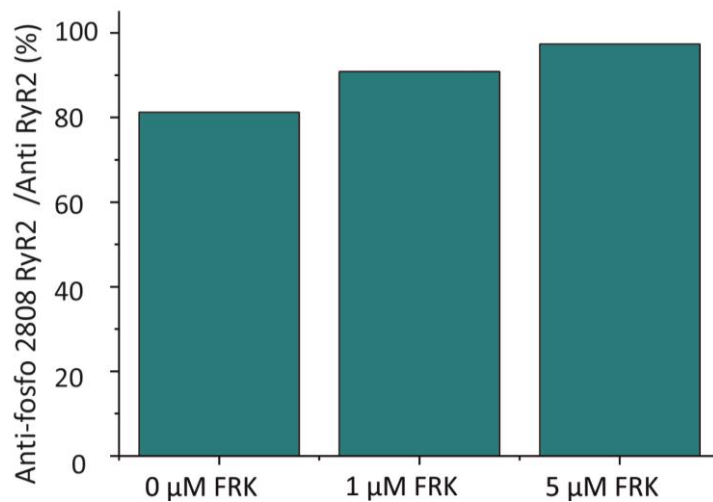


Figura 29. Nivell de fosforilació de la S2808 de RyR2 a diferents concentracions de forskolina. El nivell de fosforilació s'ha calculat a partir de quantificació de la intensitat de les bandes obtingudes en el de western blot contra la S2808 fosforilada, normalitzades per la intensitat de les bandes del western blot contra RyR2.

2.2.1.2. Acció de la forskolina en l'activitat SOICR

La fosforilació del RyR2, per part de la PKA, durant l'estimulació de la via β adrenèrgica, produeix un augment de sensibilitat del canal pel Ca^{2+} de intraluminal que es pot veure reflectit en un augment del SOICR. Per tal de determinar si l'acció de la forskolina mimetitzava l'estimulació de la via β -adrenèrgica en aquest sentit, hem analitzat l'activitat SOICR en les cèl·lules HEK293_{RyR2} WT i G357S a diferents concentracions de forskolina. Per dur-ho a terme, hem realitzat una corba dosi resposta amb diferents concentracions de forskolina (0 μ M, 0.1 μ M, 0.5 μ M i 5 μ M) a una mateixa concentració de Ca^{2+} (100 μ M), Materials i mètodes (pàg.121).

A la **Figura 30** es mostren traços temporals de fluorescència d'experiments realitzats a 0.1 μ M i a 5 μ M de forskolina. En aquesta figura es pot observar que l'activitat SOICR és molt més elevada a concentracions altes de forskolina (5 μ M), concentració en la qual, la Serina 2808 mostra un alt percentatge de fosforilació (**Figura 29**). Tal i com es pot veure a la **Figura 30**, en presència de forskolina, l'activitat SOICR és més elevada en les cèl·lules HEK293_{RyR2} G357S que en les WT, diferències que es fan més evidents a 5 μ M de forskolina. A partir d'aquests experiments hem calculat el nombre d'oscil·lacions per cèl·lula

oscil·lant (amb activitat SOICR), i ho hem representat en funció de la concentració de forskolina (**Figura 31**). Per una banda, en aquesta figura es pot observar una dependència de l'activitat SOICR a la concentració de forskolina, a mesura que augmentem la concentració de forskolina, l'activitat SOICR augmenta. Aquests fet suggereix que, en presència de forskolina, el RyR2 és més sensible al Ca^{2+} intraluminal, tal i com succeeix en els miòcits cardíacs durant l'estimulació de la via β -adrenèrgica, com a conseqüència de la fosforilació del RyR2 per la PKA. Així doncs, en les nostres condicions experimentals, la forskolina és un bon mimètic de l'estimulació de la via β adrenèrgica. D'altra banda, la **Figura 31** reflecteix que les cèl·lules HEK293_{RyR2} G357S presenten una major activitat SOICR en presència de forskolina que les cèl·lules HEK293_{RyR2} WT. Les diferències entre les dues poblacions cel·lulars es fan significatives a 0.5 μ M de forskolina, on les oscil·lacions per cèl·lula són de 1.13 ± 0.02 en HEK293_{RyR2} WT i de 1.37 ± 0.02 en HEK293_{RyR2} G357S, i a 5 μ M de forskolina, on les oscil·lacions són 1.25 ± 0.02 i 1.43 ± 0.02 , respectivament ($p < 0.001$, $n = 6$). Aquests resultats suggereixen que el canal RyR2 G357S és més sensible a les modificacions que produeix la presència de forskolina.

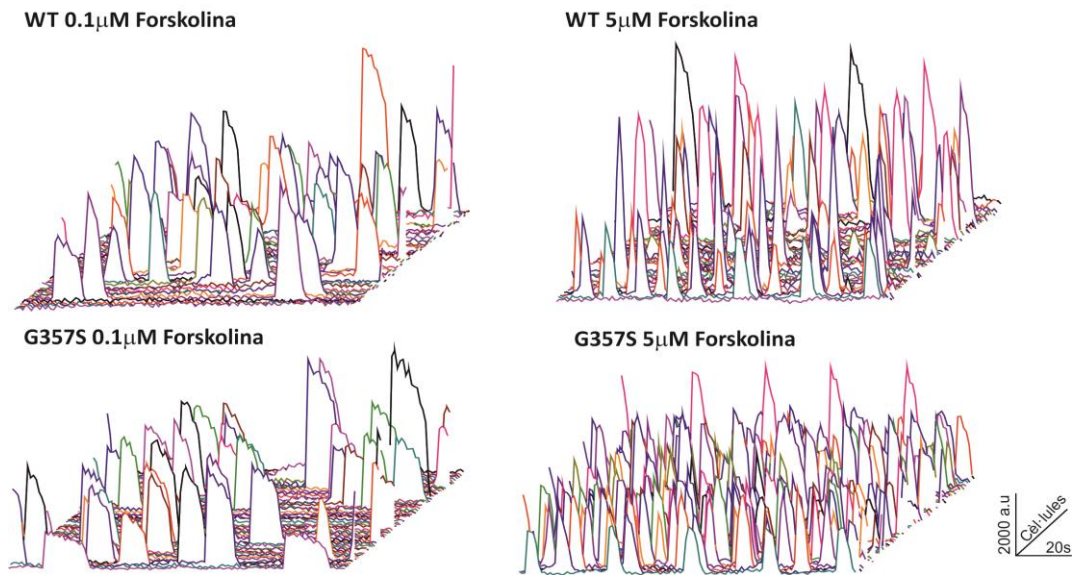


Figura 30. Traços de fluorescència de l'activitat SOICR en HEK293_{RyR2} WT o G357S a diferents concentracions de forskolina. A dalt, cèl·lules que expressen RyR2 WT, a baix, cèl·lules que expressen RyR2 G357S. A l'esquerra, activitat SOICR a 0.1μM de forskolina i a la dreta activitat SOICR a 5μM de forskolina. Cada color representa una cèl·lula diferent, n=60 en tots els casos.

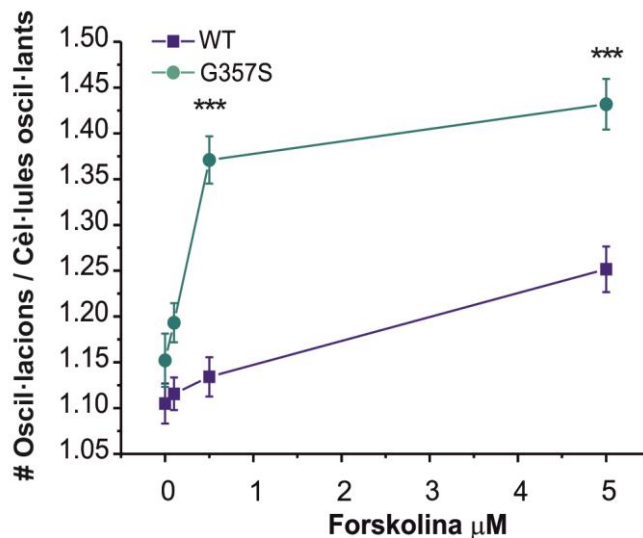


Figura 31. Activitat SOICR a diferents concentracions de forskolina. Nombre d'oscil·lacions de Ca²⁺ (activitat SOICR) per cèl·lula oscil·lant, respecte diferents concentracions de forskolina (0, 0.1, 0.5, i 5μM) en 100μM Ca²⁺. En blau, HEK293_{RyR2} WT, en verd, HEK293_{RyR2} G357S (n=6, en ambdues línies cel·lulars).

2.2.2. Anàlisi de sensibilitat a cafeïna en condicions mimètiques a estrès

Els resultats obtinguts en presència de forskolina, suggereixen que el canal RyR2 G357S és més sensible a les modificacions produïdes per la presència de forskolina. Així doncs, ens hem proposat determinar quin efecte té la presència de forskolina sobre una propietat intrínseca del canal com és la sensibilitat a cafeïna. Per dur-ho a terme, les cèl·lules HEK293_{RyR2} WT i G357S s'han perfundit amb diferents concentracions de cafeïna (0.005mM, 0.01mM, 0.025mM, 0.05mM, 0.1mM, 0.25mM i 0.5mM) en 5µM de forskolina, tal com s'indica a l'apartat de Materials i mètodes (pàg. 119).

A la **Figura 32**, es mostren els traços de fluorescència induïts per diferents concentracions de cafeïna, en presència de forskolina. En aquesta figura, es pot observar que les cèl·lules que expressen RyR2 G357S responen a concentracions més baixes de cafeïna que les que expressen RyR2 WT. A 0.01mM de cafeïna s'observa la inducció d'un transient de Ca²⁺ en cèl·lules HEK293_{RyR2} G357S que no s'observa en les WT. A més, la resposta de les cèl·lules HEK293_{RyR2} G357S es satura a 0.25mM, mentre que la resposta WT, es satura a 0.5mM. A partir d'aquest experiments, s'han realitzat les corbes dosi resposta representades a la **Figura 33**, on es pot observar que la corba de les cèl·lules que HEK293_{RyR2} G357S es desplaça cap a l'esquerra. L'anàlisi

de les corbes, ens indica que existeixen diferències significatives entre les EC_{50} per cafeïna en presència de forskolina, entre les dues poblacions cel·lulars (0.095 ± 0.01 mM pel RyR2 WT i 0.069 ± 0.01 mM pel RyR2 G357S, $p < 0.0001$, $n=7$). Així doncs, la mutació G357S, en presència de forskolina, augmenta la sensibilitat a cafeïna del canal RyR2 G357S.

El fet que la mutació G357S modifiqui una propietat intrínseca del canal, com la sensibilitat a cafeïna, només en presència de forskolina, indica que el canal RyR2 G357S és més sensible a les modificacions provocades per la forskolina (fosforilació del canal) que el canal WT.

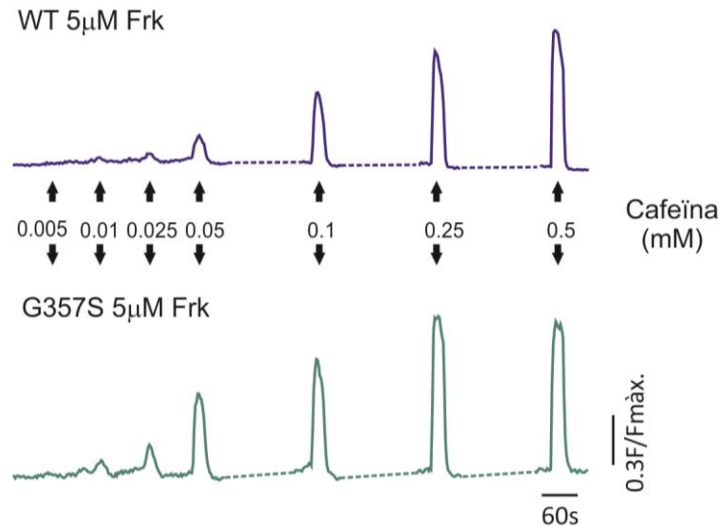


Figura 32. Traços de fluorescència representatius de les oscil·lacions de Ca^{2+} induïdes per cafeïna en condicions mimètiques a estrès. Les fletxes indiquen les diferents concentracions de cafeïna (0.005mM, 0.01mM, 0.025mM, 0.05mM, 0.1mM, 0.25mM i 0.5mM), que produeixen oscil·lacions de Ca^{2+} en cèl·lules HEK293_{RyR2} que expressen el canal WT (a dalt) o el canal amb la mutació G357S (a baix) en presència de forskolina.

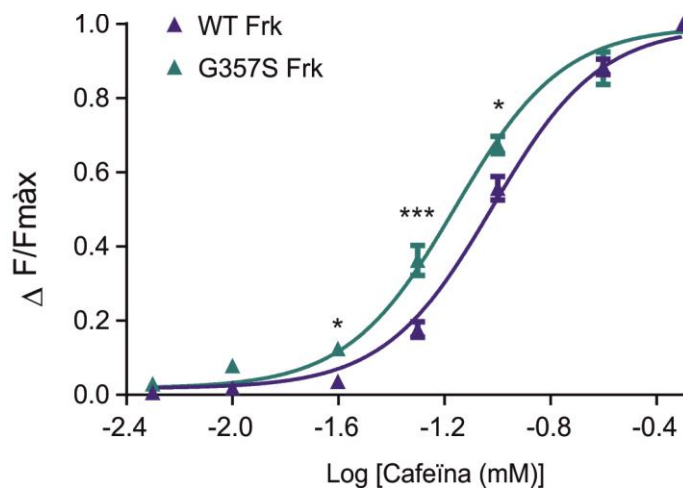


Figura 33. Corba dosi resposta a cafeïna en condicions mimètiques a estrès. Resposta a cafeïna de cèl·lules HEK293_{RyR2} WT (blau) o RyR2 G357S (verd) en presència de forskolina (Frk). L'amplitud de les diferents oscil·lacions de Ca^{2+} ($\Delta F/F_{\text{màx}}$) s'han normalitzats per la resposta màxima i es veuen representats com a funció del logaritme de les diferents concentracions de cafeïna (mM). Les corbes s'han ajustat a un model dosi resposta amb la funció $Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{Log } EC_{50} - X) * \text{HillSlope}))}$.

2.2.3. Anàlisi de l'activitat SOICR en condicions mimètiques a estrès

Donat que la mutació G357S modifica la sensibilitat a cafeïna del canal RyR2, en presència de forskolina. Ens hem proposat analitzar si la mutació G357S modifica la sensibilitat del canal pel Ca^{2+} intraluminal, en aquestes condicions. Per dur-ho a terme hem analitzat l'activitat SOICR a diferents concentracions de Ca^{2+} extracel·lular (100 μM , 200 μM , 300 μM i 500 μM) en les cèl·lules que expressen el RyR2 WT o RyR2 G357S en presència o absència de forskolina (5 μM) Materials i mètodes (pàg.121).

A la **Figura 34**, es mostren els traços de fluorescència representatius de l'activitat SOICR en presència i en absència de forskolina, en cèl·lules HEK293_{RyR2} WT i G357S, a 200 μM de Ca^{2+} . Tal i com ja havíem observat, l'acció de la forskolina augmenta l'activat SOICR que, en aquestes condicions, és major en les cèl·lules que expressen el RyR2 G357S que en les que expressen el RyR2 WT. A més, s'observa una disminució de l'amplitud dels pics o oscil·lacions de Ca^{2+} en les cèl·lules que expressen RyR2 G357S en presència de forskolina. L'anàlisi d'aquestes amplituds es representa a la **Figura 35**, on es pot observar una davallada en l'amplitud de les oscil·lacions de Ca^{2+} de les cèl·lules que expressen RyR2 G357S, respecte les que expressen RyR2 WT, en presència de forskolina ($p < 0.0001$). Fet ja observat en altres mutacions

que augmenten l'activitat SOICR com a conseqüència de l'augment de sensibilitat del RyR2 pel Ca^{2+} intraluminal.⁹⁶

La freqüència d'oscil·lacions, en presència o absència de forskolina, a diferents concentracions de Ca^{2+} , es mostra a la **Figura 36**. En totes les condicions, podem observar que a major concentració de Ca^{2+} , major és la freqüència d'oscil·lacions, fet que ja havíem observat a la **Figura 27** en absència de forskolina. La **Figura 36** mostra que, en absència de forskolina, no existeixen diferències significatives en la freqüència d'oscil·lacions entre les cèl·lules HEK293_{RyR2} WT i RyR2 G357S, però, en presència de forskolina, sí existeixen diferències significatives. A 200 μM de Ca^{2+} , la freqüència d'oscil·lacions és de 0.69 ± 0.03 per les cèl·lules que expressen RyR2 WT i de 0.90 ± 0.03 per les que expressen RyR2 G357S ($p < 0.0001$, $n_{\text{WT}}=220$, $n_{\text{G357S}}=275$), a 300 μM de Ca^{2+} és de 0.91 ± 0.035 i 1.07 ± 0.04 , respectivament ($p < 0.001$, $n_{\text{WT}}=258$, $n_{\text{G357S}}=248$) i 500 μM de Ca^{2+} és de 1.21 ± 0.04 i de 1.55 ± 0.05 , respectivament ($p < 0.0001$, $n_{\text{WT}}=234$, $n_{\text{G357S}}=298$). Així doncs, la mutació G357S, en presència de forskolina, augmenta la freqüència de l'activitat SOICR.

Tant l'augment d'activitat SOICR, com la disminució de l'amplitud de les oscil·lacions de Ca^{2+} , són trets característics de les mutacions que augmenten la sensibilitat del canal pel Ca^{2+} intraluminal. Així doncs, els resultats suggereixen que, en presència de forskolina, la mutació G357S augmenta la sensibilitat del canal pel Ca^{2+} intraluminal.

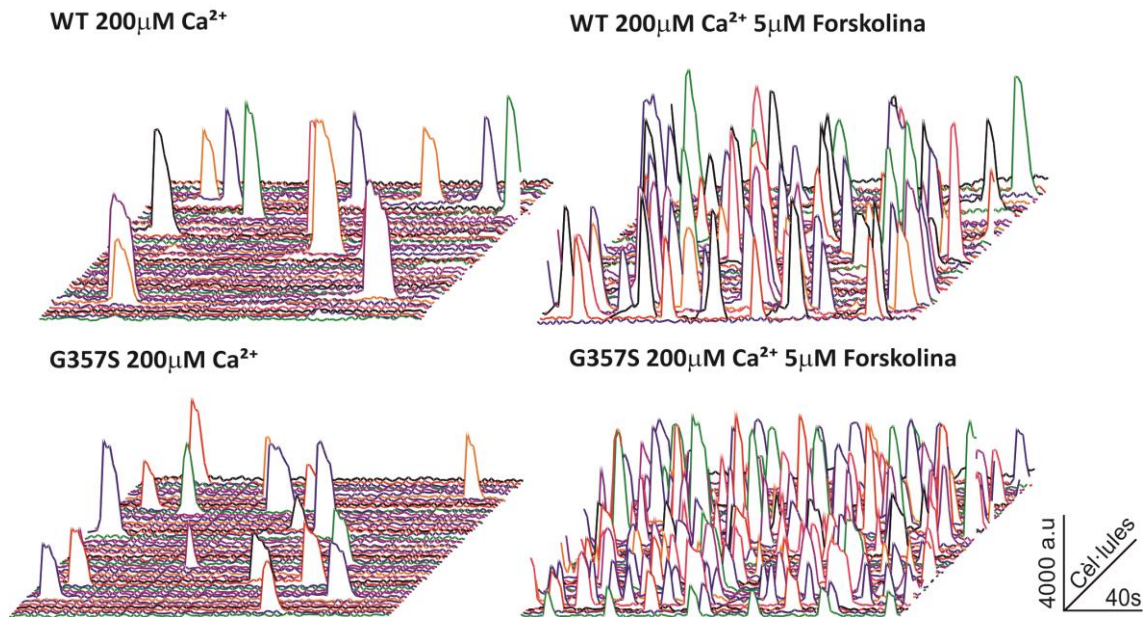


Figura 34. Traços de fluorescència de l'activitat SOICR en absència i presència de forskolina. A dalt, traços de fluorescència corresponents a oscil·lacions de Ca^{2+} de les cèl·lules que expressen RyR2 WT, a baix, de cèl·lules que expressen RyR2 G357S, en absència (esquerra) i presència (dreta) de $5\mu\text{M}$ de forskolina, en $200\mu\text{M}$ de Ca^{2+} . Cada línia de color representa una cèl·lula diferent.

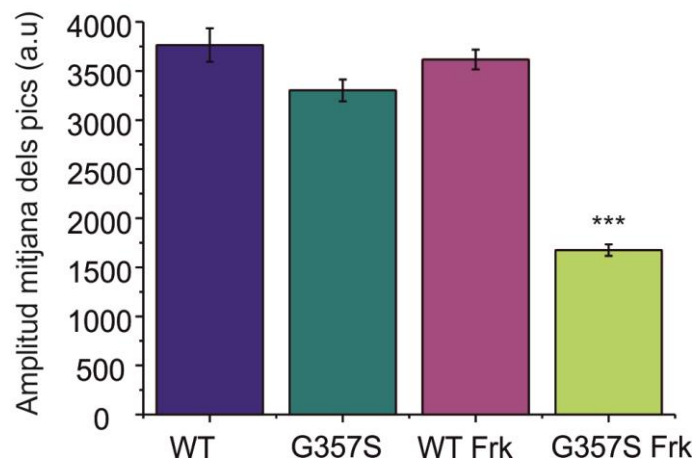


Figura 35. Amplitud de les oscil·lacions de Ca^{2+} . Anàlisi de l'amplitud mitjana de les oscil·lacions de Ca^{2+} de cèl·lules que expressen RyR2 WT o RyR2 G357S en absència o presència de $5\mu\text{M}$ de forskolina (Frk), a $200\mu\text{M}$ de Ca^{2+}

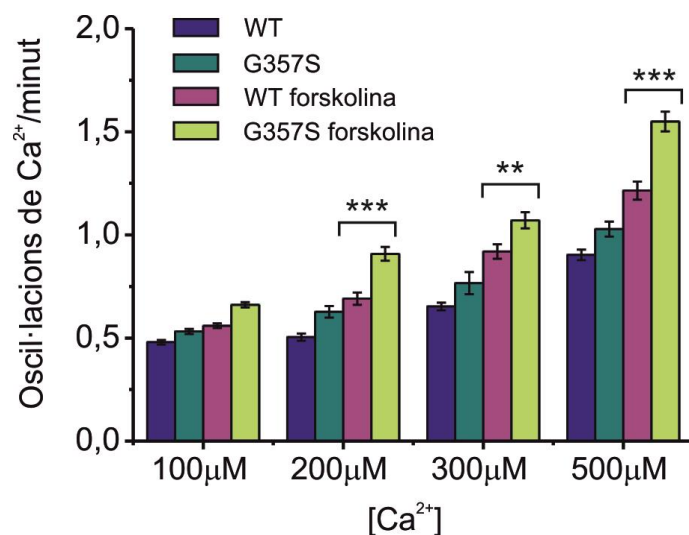


Figura 36. Anàlisi de l'activitat SOICR a diferents concentracions de Ca²⁺ en condicions mimètiques a estrès. Freqüència de les oscil·lacions de Ca²⁺ (oscil·lacions per minut), en presència o absència de forskolina (5 μM), a diferents concentracions de Ca²⁺ en cultius de cèl·lules HEK293_{RyR2} que expressen el canal WT o el canal G357S.

3. Anàlisi de proteòmica del canal RyR2

Els resultats obtinguts fins el moment, indiquen que la mutació G357S, produeix un augment d'activitat del RyR2 només en presència de forskolina, indicant que el canal RyR2 G357S és més sensible a les modificacions causades per la forskolina. La mutació produeix un canvi d'aminoàcid d'una Glicina a una Serina, aminoàcid que pot ser fosforilat per l'acció de la PKA, que s'activa en presència de forskolina o estimulació dels receptors β adrenèrgics. És per això, que ens hem plantejat que la mutació G357S podria estar introduint un nou lloc de fosforilació al canal G357S augmentant l'activitat del canal en aquestes condicions.

3.1. Anàlisi de fosforilació de la proteïna RyR2 G357S en presència de forskolina

Per tal d'avaluar si la mutació G357S introdueix un nou lloc de fosforilació al residu S357 hem realitzat assajos de fosforilació de la proteïna sencera a partir de proteïnes immunoprecipitades provinents de cèl·lules que expressen el canal RyR2 WT i RyR2 G357S tractades amb forskolina. Hem tripsinitzat les proteïnes i els pèptids obtinguts s'han analitzat per espectrometria de masses (MALDI-TOF) abans de ser analitzats per LC-MS/MS tal i com s'indica a l'apartat Materials i mètodes (pàg.127). L'anàlisi per MALDI-TOF de l'extracte de proteïnes

immunoprecipitades, ens indica que els pèptids obtinguts corresponen a la proteïna RyR2 tant en l'extracte de proteïnes de cèl·lules que expressen RyR2 WT com en l'extracte de les cèl·lules que expressen RyR2 G357S. La cobertura de la proteïna o els pèptids de la proteïna RyR2 G357S en el posterior anàlisi per LC-MS/MS, es mostra a la **Figura 37**. Tot i que el percentatge de cobertura de la proteïna és relativament alt per a una proteïna gran de membrana (cobertura del 40%), el pèptid comprès entre els residus Y355 i K380 de RyR2, que conté el residu S357, no ha estat detectat en l'anàlisi.

En un intent d'augmentar la cobertura de la seqüència proteica, els pèptids de RyR2 WT i RyR2 G357S s'han quimiolitripsinitzats i reanalitzats per LC-MS/MS. En aquest segon intent, tampoc s'ha observat el pèptid que conté el residu S357. De manera que, amb aquesta tècnica, no hem pogut avaluar si la mutació G357S introdueix un nou lloc de fosforilació al residu S357 del RyR2.

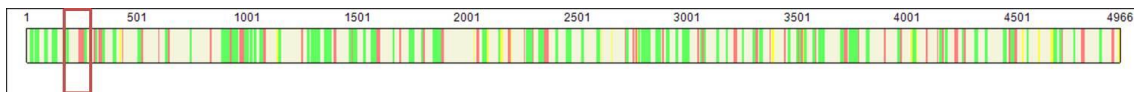


Figura 37. Cobertura de la proteïna RyR2 G357S després de l'anàlisi per LD-MS/MS. La cobertura de la proteïna després de la digestió amb tripsina és del 40%. Els números representen el número de residu de la seqüència proteica de RyR2. Els pèptid d'alta confiança es representen en verd, els de mitja, en groc i els de baixa, en vermell. El quadre vermell indica la zona compresa entre els residus Y355 i K380, que conté el residu S357.

3.2. Assaig de fosforilació *in vitro* en pèptids sintètics

Per analitzar si la mutació G357S introdueix un nou lloc de fosforilació, ens hem proposat realitzar un anàlisi de fosforilació *in vitro* en pèptids que contenen el residu WT G357 (GMGTSEIKYGDSICYIQH) o el residu MT S357 (GMGTSEIKYSDSICYIQH). Aquest pèptids sintètics s'han tractat amb PKA per posteriorment ser analitzats per MALDI-TOF, Materials i mètodes (pàg.129). Els espectres de masses d'aquesta anàlisi estan representats a la **Figura 38**, on es pot observar l'aparició d'espècies de pèptid MT fosforilat a 2111.354Da (80Da de la fosforilació), després del tractament amb PKA (panell del mig). No s'observa l'aparició d'espècies de pèptid WT fosforilat, esperades a 2081.9Da, després del tractament amb PKA (panell superior), ni tampoc de pèptid MT fosforilat sense el tractament amb PKA (panell inferior). El percentatge de pèptid fosforilat després de 3h de reacció és d'un total de $5.91 \pm 0.61\%$ ($n = 8$).

Per determinar quin és el residu del pèptid MT que es fosforila, hem analitzat el pèptid MT tractat amb PKA per LC-MS/MS. Els fragments de pèptids obtinguts per LC/MS-MS es poden observar a la **Taula 17** i a la **Figura 39**. Els ions *b* són fragments de pèptid que contenen l'inici del pèptid, mentre que els ions *y* són fragments de pèptid que contenen el final del pèptid. Els ions *b* que s'han identificat en l'anàlisi per LC-MS/MS es representen en color vermell, i els ions *y* identificats, es representen en color blau. La massa del ió *b*₁₀, que correspon al pèptid fragmentat

GMGTSEIKYS, és 1054.49Da, i correspon a la massa del pèptid sense fosforilar. Així doncs, el residu S357 del pèptid MT no es fosforila. La massa de l'ió *b*₁₂, que correspon al pèptid fragmentat GMGTSEIKYSDS, és 1336.51Da i la massa de l'ió *y*₇, que correspon al pèptid fragmentat SICYIQH, és 943.37Da. Ambdues masses corresponen a pèptids fosforilats, ja que les seves masses tenen 80Da més dels esperats, corresponents a la fosforilació, i ambdós pèptids contenen el residu S359. Així doncs, el residu que es fosforila per l'acció de la PKA, en el pèptid sintètic MT, és el S359.

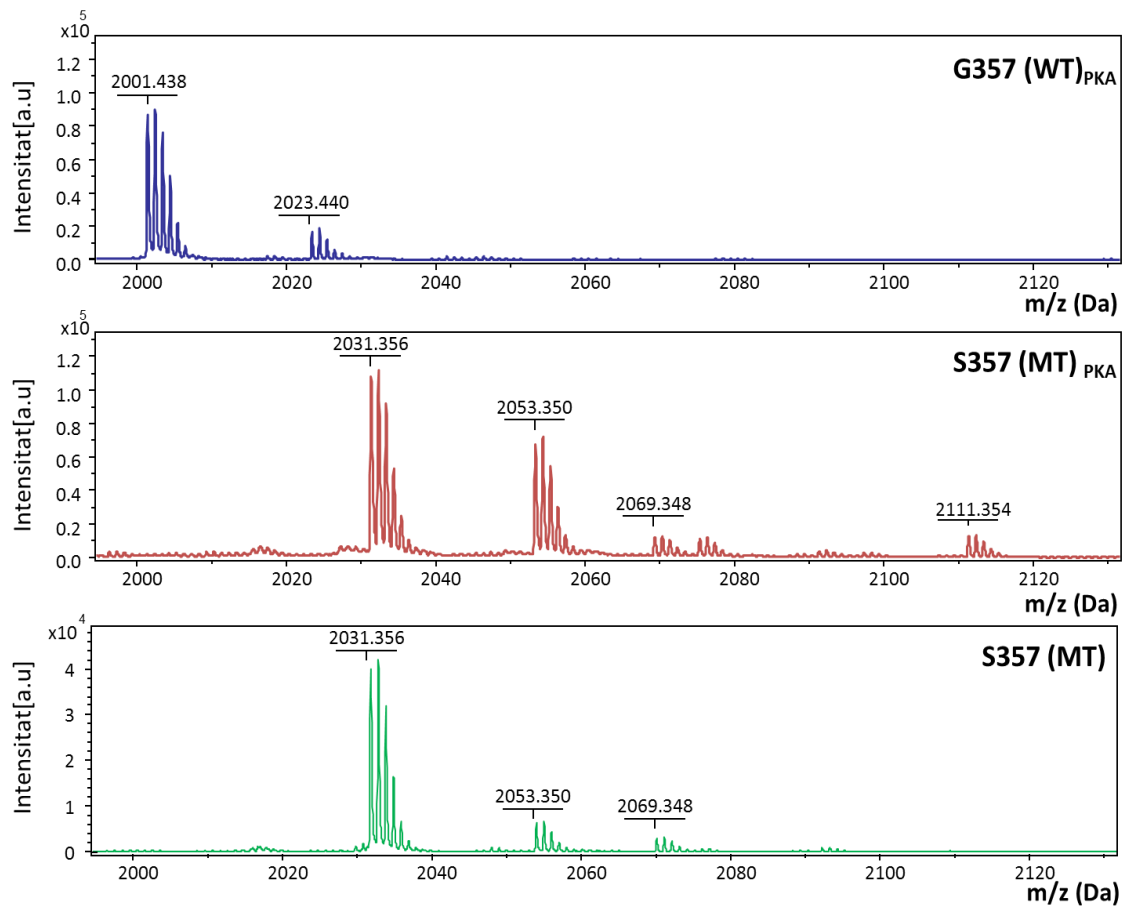


Figura 38. Espectre de masses dels pèptids WT i MT. Al panell superior, espectre de masses del pèptid WT GMGTSEIKYGDSICYIQH, tractat amb PKA, 2001.438 Da, l'espècie a 2023.440 Da és el pèptid amb un Na⁺ afegit. Al panell del mig, espectre de masses del pèptid MT GMGTSEIKYSDSICYIQH, tractat amb PKA, 2031.356 Da. L'espècie a 2111.354 Da és el pèptid fosforilat (absent sense el tractament amb PKA, panell inferior), la de 2053.350 és el pèptid amb un Na⁺ afegit i la de 2069.348 Da amb un K⁺ afegit.

Taula 17. Series iòniques identificades en el pèptid MT analitzat per LC-MS/MS.

Fragment	Ions <i>b</i> (Da)		Residu	Ions <i>y</i> (Da)		Fragment
	<i>b</i> ⁺	<i>b</i> ²⁺		<i>y</i> ⁺	<i>y</i> ²⁺	
1	58.03	29.52	G (348)			18
2	189.07	95.04	M (349)	2054.86	1027.93	17
3	246.09	123.55	G (350)	1923.82	962.41	16
4	347.14	174.07	T (351)	1866.80	933.90	15
5	434.17	217.59	S (352)	1765.75	883.38	14
6	563.21	282.11	E (353)	1678.72	839.86	13
7	676.30	338.65	I (354)	1549.68	775.34	12
8	804.39	402.70	K (355)	1436.59	718.80	11
9	967.46	484.23	Y (356)	1308.50	654.75	10
10	1054.49	527.75	S (357)	1145.43	573.22	9
11	1169.51	585.26	D (358)	1058.40	529.70	8
12	1336.51	668.76	S-Fosfo (359)	943.37	472.19	7
13	1449.60	725.30	I (360)	776.38	388.69	6
14	1552.61	776.81	C (361)	663.29	332.15	5
15	1715.67	858.34	Y (362)	560.28	280.65	4
16	1828.75	914.88	I (363)	397.22	199.11	3
17	1956.81	978.91	Q (364)	284.14	142.57	2
18			H (365)	156.08	78.54	1

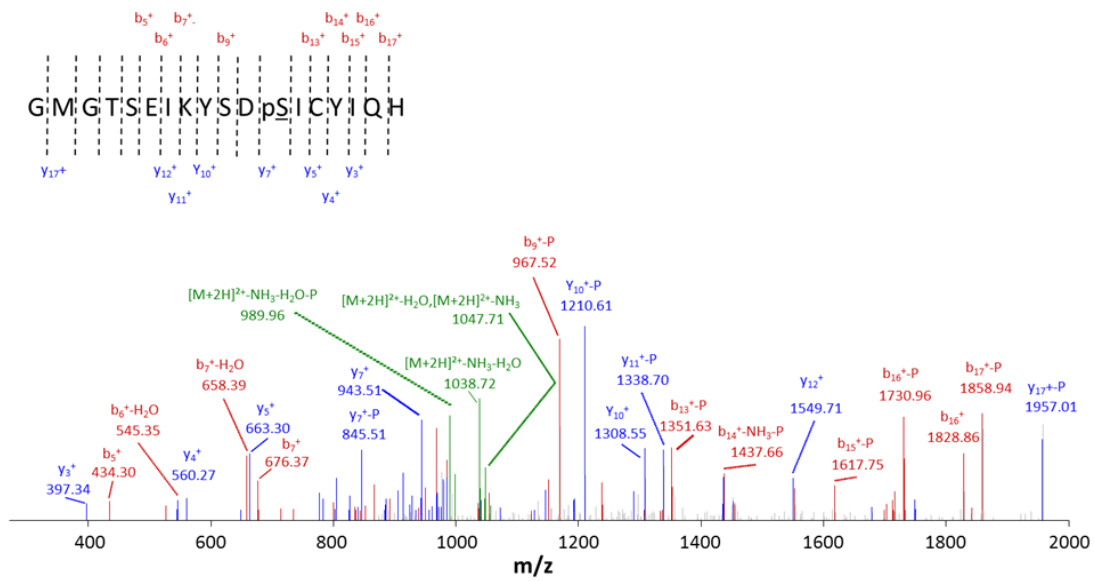


Figura 39. Espectre de masses del pèptid RyR2 obtingut en LC-MS/MS. Espectre de masses del pèptid MT GMGTSEIKYSDSICYSIQ amb la S359 fosforilada (subratllada). En vermell la sèrie de ions b, en blau, la sèrie d' ions y, en verd, els ions precursors i en gris, els pics no identificat. Els ions b i y, observats, s'indiquen a la seqüència peptídica, on també s'indica la fosforilació de la serina 359.

V. Discussió

V. Discussió

La CPVT és una malaltia associada a MSC que es caracteritza per la presència d'arítmies ventriculars polimòrfiques o bidireccionals induïdes per catecolamines durant un estrès emocional o físic. En el present projecte, hem presentat una gran família de les Illes Canàries amb una llarga història de MSC a edats molt joves (36 familiars morts amb una mitjana d'edat de 18 ± 8 anys). Les circumstàncies d'aquestes morts i els estudis clínics realitzats als familiars vius indiquen que la malaltia que pateixen aquests pacients és la CPVT.

L'anàlisi dels principals gens associats a CPVT en el cas índex, ens ha permès la identificació de la mutació G357S en el gen RyR2. El conseqüent estudi de lligament i la presència de la mutació en tots els individus afectat indiquen que la mutació G357S és, probablement, la mutació causant de la CPVT en aquesta gran família. Aquests fet es corrobora amb les evidències experimentals obtingudes en l'estudi funcional de la mutació, que demostren que la mutació G357S produeix un guany de funció al canal RyR2 en condicions mimètiques a estrès. Així doncs, aquestes evidències experimentals donen suport al rol patogènic de la mutació G357S i assenyalen una possible explicació al fenotip de la CPVT en aquesta família.

1. Causa genètica de la CPVT a la família de les Illes Canàries

Entre un 50% i un 60% de casos de CPVT estan causat per mutacions als gen que codifica per les proteïna del reticle sarcoplasmàtic RyR2.^{23,34} En el present treball, l'estudi genètic d'aquest gen, ha permès la identificació de la mutació *missense* G357S en 208 membres d'una mateixa família. La mutació G357S es troba a l'exó 13 i es localitza en un dels *hot spots* de mutacions del gen *RyR2*, en concret, en el domini I o N-terminal que comprèn el 18% de les mutacions del RyR2 associades a CPVT.²⁰ Tot i que la funció d'aquests *hot spots* de mutacions no es coneix amb exactitud, s'ha proposat que les mutacions en aquests punts debiliten la unió entre dominis del RyR2 i desestabilitzen el canal.¹⁰³ La presència de la mutació G357S dins d'un d'aquests *hot spots*, dona suport al possible rol patogènic de la mutació G357S. En aquest sentit, les eines *in silico* utilitzades, basades en la homologia de seqüències durant l'evolució i/o les similituds dels aminoàcids en relació a l'estabilitat i funció proteica, determinen que la mutació G357S és possiblement patogènica. L'actual associació de la mutació G357S a altres casos de CPVT, aparentment, no relacionats amb la família de les illes Canàries, també avala el rol patogènic d'aquesta mutació.^{34,118}

Tot i aquests indicis que donen suport al possible rol patogènic de la mutació G357S, hem utilitzat un anàlisi de lligament per certificar que el

locus de la CPVT en aquesta família es troba al RyR2. Aquesta anàlisi ha determinat que el locus es troba en el cromosoma 1 entre les posicions Chr1:237414187-237414519pb i Chr1:240876770-240876947pb, posicions entre les quals es troba el RyR2 i la mutació G357S (Chr1:237604682), en els individus afectats. Així doncs, l'anàlisi de lligament juntament amb les anàlisis genètiques suggereixen que la mutació G357S és, probablement, la mutació causal de la CPVT en aquesta gran família.

Les evidències que senyalen la mutació G357S com a mutació patogènica i causal de la malaltia, han donat suport a la realització d'un test genètic en cascada dels familiars per identificar els membres portadors de la mutació G357S. El test genètic en cascada, ha permès la identificació de 199 portadors vius de la mutació G357S, el 75% dels quals, no havia tingut símptomes previs de la malaltia.¹²⁴ Individus, potencialment en risc de patir MSC, ja que, en un 30% del casos de CPVT, la MSC és la primera manifestació clínica de la malaltia.²³ La identificació dels portadors ha permès la implantació, per part de l'equip mèdic, d'un protocol clínic basat en la realització de proves d'esforç seriades (cada 3 mesos) i un tractament farmacològic amb β -bloquejants en tots els portadors de la mutació G357S. En els casos més severos, aquest tractament ha estat acompanyat de la implantació d'un desfibril·lador.¹²⁴

De la mateixa manera que en estudis previs,⁴⁸ la identificació dels portadors i el seu subseqüent seguiment i tractament, ha permès la prevenció de la MSC, ja que no s'ha registrat cap MSC en els portadors de la mutació G357S sota observació i tractament. Un total de 53 membres de la família es van negar a fer l'estudi genètic, d'aquest grup, 3 individus han patit MSC durant exercici o emoció. Les corresponents anàlisis genètiques, posteriors a la MSC, han resultat ser positives per la mutació G357S en tots 3 individus. El fet que hi hagi hagut 3 MSC en portadors de la mutació, no identificats prèviament, i que no n'hi hagi hagut en els portadors en observació i tractament, dona suport a les recomanacions de realitzar un estudi genètic en cascada dels familiars un cop trobada la mutació en el cas índex.^{33,46,48} Aquest test genètic permet identificar individus en risc i implantar tractaments profilàctics per evitar la MSC en els portadors asimptomàtics. Així doncs, la present tesi, reforça la importància dels estudis genètics en malalties com les canalopaties, en les que, la MSC pot ser un dels primers símptomes de la malaltia. El test genètic pot acabar de confirmar el diagnòstic de la malaltia, especialment, en aquells casos on el fenotip no es prou conclusiu, i permetre la identificació d'individus asimptomàtics en risc.³

Estudis clínics realitzats a portadors de mutacions al RyR2, identificats mitjançant un test genètic en cascada, mostren una alta incidència d'arítmies ventriculars en la primera prova d'esforç.^{41,46} Haugaa i col.

(2010), mostren que el 77% d'aquests individus presenten signes de la malaltia en la primera prova d'esforç. No obstant això, els estudis clínics realitzats als portadors de la mutació G357S de la família de Canàries, duts a terme pel Dr. Wangüemert i el Dr. Ruiz, indiquen que només el 46.3% d'ells presenten arítmies ventriculars en la primera prova d'esforç, dada que difereix del 77% descrit pel grup de Haugaa i col..¹²⁴ La penetrància i l'expressivitat de la malaltia depenen molt del patrimoni genètic de cada individu. En aquest sentit, diversos estudis en diferents canalopaties, han demostrat que la coexistència de polimorfismes i mutacions en un mateix canal iònic, pot produir un efecte modulador en el fenotip de la malaltia.^{125,126} En referència a CPVT, Postma i col. (2005) van demostrar que la coexistència de les mutacions G4662S i H4726P en el RyR2, provocava CPVT als pacients portadors d'ambdues variants, però no als pacients que només eren portadors d'una d'elles.³¹ Aquests estudis senyalen que la coexistència de dues variants pot ser imprescindible perquè es doni el fenotip aritmogènic en una determinada canalopatia, destacant la importància, en la penetrància i expressivitat de la malaltia, del patrimoni genètic. Aquestes aportacions, i el fet que només el 46.3% dels portadors de la mutació G357S desenvolupin arítmies ventriculars en la primera prova d'esforç, ens han conduït a cercar altres variants amb una possible funció moduladora de la mutació G357S. Els resultats obtinguts ens indiquen que no existeix cap polimorfisme o variant rara a la zona codificant del *RyR2* ni del *CASQ2*,

que comparteixin els afectats, que pugui produir un efecte modulador de la mutació G357S respecte la malaltia. Seguint aquesta línia, gràcies als avenços en el camp de la genètica i a la incorporació de noves tecnologies que permeten l'obtenció de resultats en temps relativament curts, hem analitzat la presència d'altres mutacions o variants rares en 55 gens associat a MSC. Els resultats d'aquestes anàlisis indiquen que, en aquests 55 gens no existeix cap altre mutació o variant rara que pugui causar un efecte modulador de la mutació G357S que repercuteixi en el grau d'expressivitat i/o penetrància de la CPVT en aquesta família. Tot i que els resultats obtingut no expliquen el perquè de la baixa penetrància i expressivitat de la malaltia en els nostres pacients, no podem descartar la presència d'altres variants en altres zones, que puguin tenir un efecte modulador de la mutació G357S en vers la malaltia.

Tal i com s'ha esmentat a la introducció, el grau de penetrància i expressivitat de la malaltia no només depèn del patrimoni genètic de cada individu sinó que també pot ser conseqüència de l'efecte funcional específic de cada mutació, és a dir, les mutacions que causen grans defectes funcionals a la proteïna produeixen un fenotip més sever de la malaltia.⁴⁵ En aquest sentit, Bauce i col. (2002)⁴⁷ mostren un rang de penetrància que va des del 25% al 100%, segons la mutació que s'estudia, assenyalant que cada mutació té un efecte específic en vers la malaltia. Així doncs, les diferències observades en la manifestació

fenotípica de la malaltia, entre el nostre estudi i el realitzat per Haugaa i col. (2010)⁴⁶, poden ser degudes a efectes funcionals específics de la mutació G357S. Aquest fet destaca la importància d'esbrinar els mecanismes funcionals pels quals la mutació G357S produeix la malaltia.

2. Mecanismes de patogenicitat associats a la mutació G357S.

En l'actualitat, 176 mutacions al RyR2 han estat associades a CPVT, però només un 15% d'aquestes (n=26) han estat estudiades funcionalment, segons la base de dades HGMD³⁵. El fet que només una minoria de les mutacions s'estudiïn funcionalment dificulta la determinació del mecanismes moleculars pels quals les mutacions al RyR2 alteren les propietats fisiològiques del canal en CPVT. En la present tesi, tant els estudis genètics, com l'anàlisi de lligament, senyalen la mutació G357S com la possible mutació causant de la CPVT en la gran família de les Illes Canàries. Així doncs, ens hem proposat determinar els mecanismes de patogenicitat associats a la mutació G357S del RyR2.

2.1. Funció del canal RyR2 G357S en condicions basals

La cafeïna és un lligant exogen del RyR2 molt utilitzat com a eina experimental per determinar les funcions del canal.⁶⁵ És un agonista del canal que augmenta la sensibilitat del RyR2 pel Ca^{2+} intraluminal i produeix la sortida de Ca^{2+} de l'interior del SR.⁶⁶ Tot i que la majoria de mutacions del RyR2, que s'han estudiat funcionalment, produeixen un canvi en la sensibilitat del canal per la cafeïna,^{95,97,104,120} la mutació G357S no modifica aquesta propietat del canal. Els resultats obtinguts

indiquen que no existeixen diferències en la relació dosi-resposta a cafeïna del canal RyR2 WT i RyR2 G357S, suggerint que, en condicions basals, la sensibilitat del canal per la cafeïna no es veu afectada per la mutació G357S.

Estudis funcionals realitzats pel grup de Guo Guang Du i col. al 2001 en mutacions introduïdes al porus de canal, mostren l'existència de mutacions que no modifiquen la sensibilitat a cafeïna del canal però sí modifiquen la conductància unitària del canal. Aquestes mutacions són mutacions que afecten directament al porus del canal, regió íntimament relacionada amb la conductància o permeabilitat dels ions.¹¹⁹ Tot i la baixa mida mostral, els nostres estudis de canals únics reconstruïts en bicapes lipídiques artificials, mostren que el canal RyR2 G357S presenta una conductància unitària molt similar a la del canal WT. Així doncs, aquest resultat indiquen que la mutació G357S no produeix cap canvi en la conductància unitària del canal. Fet esperat, ja que, la mutació G357S es troba a la regió citosòlica del canal, molt allunyada de la regió del porus.⁶²

S'ha demostrat que l'activitat SOICR està directament relacionada amb la generació de DADs durant la diàstole, DADs que poden produir activitat desencadenada i com a conseqüència un focus arítmic que pot conduir a la MSC.²⁰ En aquest sentit, la majoria de mutacions al RyR2, associades a CPVT i estudiades funcionalment, mostren una major activitat SOICR

tant en els models cel·lulars, com en els models animals,^{21,95–99,122,127,128} però això no succeeix en el cas de la mutació G357S. Els resultats obtingut indiquen que, en condicions basals, no existeixen diferències entre l'activitat SOICR de les cèl·lules que expressen el RyR2 WT i les cèl·lules que expressen el RyR2 G357S. Així doncs, en aquestes condicions, la mutació G357S no modifica l'activitat SOICR. Tant la sensibilitat a cafeïna com l'activitat SOICR estan directament relacionades amb la sensibilitat del canal pel Ca^{2+} intraluminal, essent mesures indirectes d'aquesta propietat del canal.^{20,71} Així doncs, el fet que la mutació G357S no modifiqui l'activitat SOICR ni la sensibilitat del RyR2 a cafeïna, en condicions basals, suggereix que la mutació G357S no modifica la sensibilitat del canal pel Ca^{2+} intraluminal.

2.2. Funció del canal RyR2 G357S en condicions mimètiques a estrès

Les arítmies en CPVT es donen en situació d'estrès emocional o físic, quan es produeix un augment de l'activitat simpàtica que acaba produint l'estimulació dels receptors β -adrenèrgics del miòcits cardíacs.²⁷ L'estimulació d'aquests receptors produeix l'augment d'AMPC i l'activació de la PKA que acaba fosforilant, entre altres dianes, els RyR2. Els resultats discutits fins al moment, ens indiquen que la mutació G357S no modifica ni la sensibilitat del canal a cafeïna ni l'activitat SOICR, de manera que, ens hem proposat analitzar les funcions del canal RyR2

G357S en condicions mimètiques a estrès per catecolamines, utilitzant forskolina. La forskolina activa l'adenilat ciclase i augmenta l'AMPc a l'interior de la cèl·lula, produint l'activació de la PKA. Per tal d'avaluar si la forskolina és un bon mimètic de l'estimulació de la via β -adrenèrgica en les cèl·lules HEK293_{RyR2}, hem analitzat la fosforilació del canal i l'activitat SOICR d'aquestes cèl·lules després del tractament amb forskolina. Els resultats dels nostres estudis indiquen que la forskolina acaba produint la fosforilació del RyR2 en el residu S2808, residu que, juntament amb el S2030, és fosforilat per l'acció de la PKA durant l'estimulació dels receptors β -adrenèrgics.^{83,123} S'ha demostrat que la fosforilació del RyR2 durant estrès emocional o físic produeix una disminució del llindar d'activació del RyR2 pel Ca^{2+} intraluminal, fent que el canal sigui més sensible a la concentració de Ca^{2+} de dins del RS.^{85,124} Els nostres experiments mostren que la forskolina produeix un augment de l'activitat SOICR, tant en el cultiu de cèl·lules que expressa el RyR2 WT, com en el que expressa el RyR2 G357S. Aquest augment d'activitat SOICR pot ser compatible amb l'augment de fosforilació del RyR2, que augmenta la sensibilitat del RyR2 pel Ca^{2+} intraluminal, i/o també amb un augment de fosforilació de fosfolamban, que produeix un increment de la recaptació de Ca^{2+} a l'interior del reticle per part de la bomba SERCA.⁸ Així doncs, aquests resultats validen l'ús de la forskolina com a mimètic de l'estimulació de la via β -adrenèrgica en cèl·lules HEK293_{RyR2}.

Els experiments dosi-resposta a forskolina indiquen que les cèl·lules que expressen el RyR2 G357S presenten una major resposta a forskolina (activitat SOICR) que les que expressen RyR2 WT, suggerint que el canal G357S és més sensible a les modificacions produïdes per la forskolina. En aquest sentit, els experiments de sensibilitat a cafeïna, en presència de forskolina, mostren un desplaçament cap a l'esquerra de la corba dosi-resposta a cafeïna de les HEK293_{RyR2} G357S. Aquests fet, indica que canal G357S és més sensible a cafeïna que el canal WT en condicions mimètiques a estrès. En presència de forskolina, les cèl·lules HEK293_{RyR2} G357S també mostren una major freqüència d'oscil·lacions espontànies de Ca²⁺ (activitat SOICR) i una disminució de l'amplitud d'aquestes oscil·lacions, que suggereix que, en aquestes condicions, la mutació G357S redueix el llindar d'activació del RyR2 pel Ca²⁺ de l'interior del reticle.^{91,96} Així doncs, tant l'augment de sensibilitat a cafeïna com l'augment d'activitat SOICR, en presència de forskolina, indiquen que la mutació G357S augmenta la sensibilitat del canal pel Ca²⁺ intraluminal en condicions mimètiques a estrès i produeix un guany de funció del canal. Aquest fet indica que la fosforilació del canal RyR2 G357S, durant l'estimulació de la via β-adrenèrgica, és necessària per desemmascarar el rol patogènic de la mutació G357S.

La majoria de mutacions que produeixen un augment de sensibilitat del canal pel Ca²⁺ intraluminal produeixen un augment de sensibilitat a

cafeïna i un augment de SOICR en condicions basals,^{95,96,98,128} però, aquest no és el cas de la mutació G357S, que només mostra un augment de la funció en presència de forskolina. Els resultats obtinguts en l'estudi funcional de la mutació G357S mostren una certa similitud amb els resultats de l'estudi funcional per la mutació V2475F del RyR2, obtinguts pel grup de Loaiza i col. (2013). De la mateixa manera que la mutació G357S, en estat basal, la mutació V2475F no produeix una modificació de l'activitat SOICR en les cèl·lules HEK293, però, en condicions d'estrès, els miòcits aïllats del ratolí transgènic V2475F+/- mostren un augment en l'activitat SOICR que produeix el fenotip aritmogènic al ratolí. Segons aquest estudi, aquest fet es succeeix com a conseqüència de que la mutació V2475 altera l'estat de fosforilació del canal RyR2 produint un augment de la funció del canal en condicions d'estrès.¹²⁹

El fet que el canal RyR2 G357S sigui més sensible a les modificacions provocades per l'efecte de la forskolina i que la mutació introdueixi una serina, residu que, en principi, pot ser fosforilat per PKA, ens ha fet plantejar que la mutació podria estar introduint un nou lloc de fosforilació per PKA en el RyR2. L'estudi de proteòmica *in vitro* mitjançant pèptids sintètics indica que la fosforilació del residu mutat (S357) és poc probable, però mostra que la introducció de mutació G357S crea un nou lloc de fosforilació per PKA en el residu S359, fosforilació, que no està present en el pèptid WT. Aquest nou lloc de fosforilació podria explicar

que el canal RyR2 G357S sigui més sensible a les modificacions provocades per l'efecte de la forskolina que el canal WT, no obstant això, la recent resolució de l'estructura completa del canal RyR1, sembla indicar que tant el residu S357 com el residu S359 es situarien en un vestíbul intern del canal on, molècules grans com les quinases (65Åx45Åx45Å, volum de subunitat catalítica de la PKA)¹³⁰ no podrien accedir per fosforilar-los (**Figura 40**).⁶² Aquest fet, juntament amb que per espectrometria de masses no s'ha pogut detectar el pèptid corresponent al residu S359 del RyR2 purificat, ens impedeixen afirmar que la mutació G357S introdueix un nou lloc de fosforilació per PKA al residu S359 i que, aquesta fosforilació, sigui la responsable de que el canal G357S sigui més sensible a les modificacions provocades per l'efecte de la forskolina.

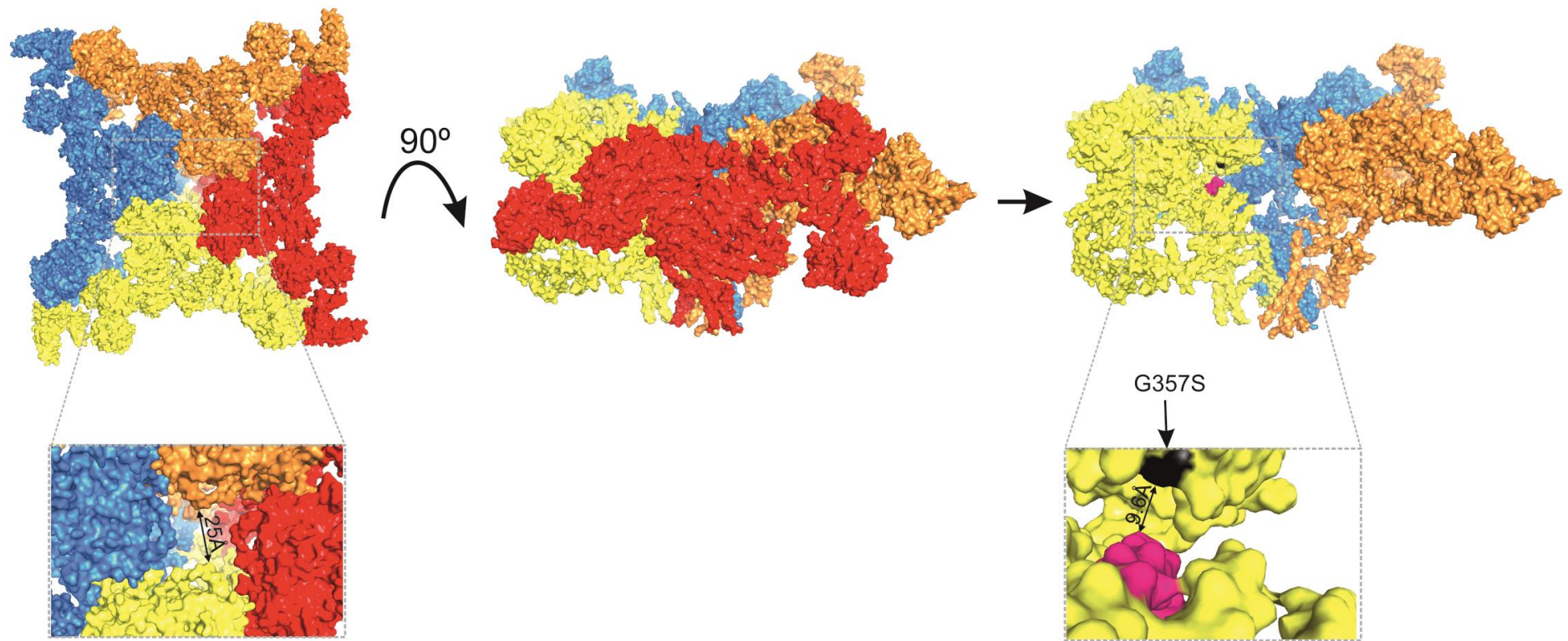


Figura 40. Ubicació de la regió dels residus S357 i S359 a l'estructura del RyR1. A l'esquerra, tetràmer de RyR1 vist des de la regió citosòlica i ampliació de l'entrada del porus. Cada color representa un monòmer de RyR1. Al centre, tetràmer de RyR1 vist des del costat. A la dreta estructura del RyR1 sense un dels monòmers, permet veure el porus del canal (25Å) i la cavitat interna (9.6Å) on es situa el residu S357 (negre) el S359 (no s'observa a la figura perquè queda darrera del S357). En rosa, regió oposada a la mutació. Figures obtingudes pel programa Pymol a partir de la molècula 3J8E publicada per Zalk i col. Nature. (2014).

2.3. Conseqüències funcionals de la mutació G357S

Els estudis funcionals realitzats en aquesta tesi suggereixen que la mutació G357S no canvia la funció del canal per si sola, tal com fan altres mutacions del RyR2 associades a CPVT,^{95,96,122} sinó que necessita de l'estimulació dels receptors β -adrenèrgics per produir una disfunció del canal. Així doncs, la fosforilació del canal RyR2 G357S es necessària per desestabilitzar-lo i causar l'efecte patogènic associat a la mutació. El fet que la patogenicitat de la mutació G357S només es desemmascari en presència de forskolina, indica que l'efecte funcional específic de la mutació G357S és moderat. Aquests fet correlaciona amb el fet que només el 46.3% dels portadors de la mutació G357S mostrin signes de la malaltia a la primera prova d'esforç.¹²⁴ Tal i com postula Marian A.J (2014), la penetrància i el fenotip d'una malaltia depenen, en part, de l'efecte funcional específic de cada mutació que, juntament amb el patrimoni genètic de l'individu i les condicions ambientals determinen seva manifestació fenotípica. De manera que, una mutació amb efecte funcional moderat, com la G357S, produirà la malaltia en certes condicions, en aquest cas quan el canal està fosforilat, però en altres no.⁴⁵

Tal i com s'ha explicat a la introducció, s'han proposat dos mecanismes pels quals les mutacions al RyR2 poden augmentar la funció del canal que, en el cas de la mutació G357S, es produeix per un augment de

sensibilitat del canal pel Ca^{2+} de l'interior del reticle. Un dels mecanismes proposat és que les mutacions al RyR2, en condicions d'estrès, desestabilitzen la unió entre el canal i la proteïna FKBP12.6, desestabilitzant l'estat tancat del canal.^{78,79} Però s'ha demostrat que la majoria de mutacions al RyR2 no produeixen una disminució de la unió entre FKBP12.6 i RyR2,^{77,95,96,104} de manera que, aquest mecanisme està molt discutit. Pel que fa a la mutació G357S, és molt poc probable que el mecanisme pel qual la mutació produeix un guany de funció sigui conseqüència d'una unió deficient entre FKBP12.6 i RyR2. En primer lloc, perquè, en l'actualitat, existeixen evidències de que la PKA no està involucrada en la dissociació de la FKBP12.6 i el RyR2.^{81,82} I en segon lloc, perquè la mutació G357S es localitza en el *hot spot* de mutacions del domini N-Terminal, lluny del lloc d'unió de la proteïna FKBP12.6, que es situa a la perifèria del peu citoplasmàtic del canal.^{61,131} En aquest sentit, s'ha demostrat que la majoria de mutacions d'aquesta regió no modifiquen la unió entre el RyR2 i FKBP12.6.^{95,96,104}

L'altre mecanisme proposat per explicar l'efecte funcional de les mutacions al RyR2 és la teoria *domain unzipping*. S'ha proposat que les mutacions al RyR2 produeixen canvis estructurals que interfereixen en la unió entre el domini N-Terminal i el domini central del RyR2 i desestabilitzen l'estat tancat del canal, alterant la seva funció.¹⁰³ En l'actualitat, es coneix que el domini N-terminal està format per 3 dominis

(A, B i C), units per una interfase hidrofílica, i 6 interfases que permeten la interacció entre dominis, entre dominis de subunitats veïnes i entre altres regions del canal.^{60,132} La majoria de mutacions associades a CPVT de la regió N-terminal del RyR2, es situen en alguna d'aquestes interfases, com la mutació G357S que es localitza a la interfase 5.^{60,61} Kimlicka i col. (2013) suggereixen que les mutacions en aquestes interfases, modifiquen l'orientació relativa dels dominis A, B i C produint grans canvis estructurals a la regió N-Terminal que, tal i com indica la teoria *domain unzipping*, interfereixen en la unió d'aquesta regió i el domini central, desestabilitzant l'estat tancat del canal i alterant la seva funció.^{61,102,103} En aquest sentit, la recent publicació de l'estudi funcional de la regió N-terminal del RyR2 senyala la importància d'aquesta regió en la regulació de la funció del canal, indicant que les modificacions en algun d'aquest dominis (A, B o C) desestabilitzen l'estat tancat del canal alterant la seva funcionalitat. Cal destacar que l'estudi funcional d'aquest dominis indica que el domini B, on es localitza la mutació G357S, és important en l'activació del canal en termes de sensibilitat a cafeïna i activitat SOICR, propietats que, segons els nostres estudis funcionals, es veuen afectades per la mutació G357S en presència de forskolina.

Els resultats obtinguts per la mutació G357S, juntament amb el que postula la teoria *domain unzipping* i l'estudi funcional dels dominis A, B i C de la regió N-terminal, suggereixen que, quan el canal G357S està

fosforilat, la presència de la mutació G357S a la interfase 5 del domini B, modificaria l'orientació relativa dels dominis A, B i C. Aquesta modificació produiria canvis estructurals a la regió N-terminal que desestabilitzarien la unió entre aquest domini i el domini central, desestabilitzant l'estat tancat del canal. Aquest fet produiria un augment de la sensibilitat del canal RyR2 G357S pel Ca^{2+} de l'interior del reticle que, en els nostres estudis funcionals, es reflecteix amb un augment de la sensibilitat del canal a cafeïna i un augment de l'activitat SOICR en presència de forskolina.^{61,103}

En el context dels miòcits cardíacs, l'augment de sensibilitat del canal RyR2 G357S pel Ca^{2+} intraluminal, augmentaria la sortida espontània de Ca^{2+} del reticle en condicions de repòs (diàstole). La sincronització de diverses sortides espontànies de Ca^{2+} podrien produir una onada de Ca^{2+} que activés NCX. L'activació de NCX produiria una entrada de Na^+ al miòcit cardíac que modificaria el seu potencial de membrana produint DADs.¹⁹ Si l'amplitud de les despolaritzacions és suficient, es podrien arribar a activar els canals de Na^+ dependents de voltatge de la membrana del miòcit cardíac i produir un PAC a destemps. La sincronització d'aquests PACs en diversos miòcits cardíacs contigus, o bé, la presència d'un substrat vulnerable com a conseqüència de l'alternança dels cicles de Ca^{2+} , podrien acabar produint activitat desencadenada o una

reentrada que produís una arítmia fatal en els portadors de la mutació G357S.¹⁰⁴

Els estudis funcionals de la mutació G357S s'han realitzat amb cèl·lules HEK293, cèl·lules no excitable, de manera que no podem concloure com la mutació G357S produeix les arítmies en els pacients afectats per CPVT d'aquesta família. Per tal d'esbrinar-ho caldrien estudis en cèl·lules pluripotents derivades de pacients (IPS) i estudis en models animals transgènics, que permetrien esbrinar com el guany de funció del RyR2 G357S produeix una activitat elèctrica anòmla en el miòcit cardíac que genera arítmies en els pacients. Aquest estudis, a més, permetrien determinar la funcionalitat del canal en un ambient més fisiològic ja que el context bioquímic i les interaccions proteiques que es donen en cèl·lules HEK293 són diferents a les que es donen en els miòcits cardíacs.

Tot i això, l'estudi realitzat en aquesta tesi doctoral aporta evidències moleculars de com la mutació G357S del RyR2 produeix la disfunció del canal en condicions mimètiques a estrès β -adrenèrgic (i.e., activitat de l'adenilat ciclase augmentada amb l'agonista forskolina). Els resultats obtinguts suggereixen que és necessària la fosforilació del canal per desemmascarar l'efecte patogènic de la mutació G357S indicant que, per si sola, la mutació té un efecte funcional moderat. Fet que, en part, pot explicar el fenotip variable i la penetrància incompleta de la CPVT observada en aquesta família. Tot i que la malaltia presenta expressivitat

variable i penetrància incompleta, en un 30% dels casos, la primera manifestació fenotípica de la CPVT és la MSC, fet que remarca la importància d'identificar els individus en risc. L'estudi genètic realitzat en aquesta tesi reforça clarament aquesta idea, ja que la identificació dels portadors de la mutació G357S, i els seu conseqüent control i tractament, han permès evitar les MSC en aquesta gran família de l'illa de Gran Canària.

En conjunt, aquesta tesi contribueix a ampliar el coneixement dels mecanismes moleculars pels quals les mutacions al RyR2 alteren la homeòstasi del Ca^{2+} intracel·lular en CPVT, i reforça l'ús de la genètica per identificar individus en risc i evitar la MSC.

VI. Conclusions

VI. Conclusions

1. L'estudi realitzat en aquesta tesi proporciona evidències genètiques i mecanístiques que permeten establir un enllaç entre la CPVT i la mutació G357S del RyR2. La mutació G357S és la responsable de la CPVT que pateixen els membres de la gran família de les Illes Canàries.
2. La identificació dels portadors de la mutació G357S ha permès evitar la MSC. Fet que dona suport a les recomanacions de realitzar un estudi genètic en cascada dels familiars, un cop trobada la mutació causal de la malaltia. L'ús de la genètica permet identificar individus asimptomàtics en risc i implantar un tractament profilàctic que permeti evitar la MSC.
3. La mutació G357S produeix un guany de funció del canal RyR2 en condicions mimètiques a l'estimulació de la via β -adrenèrgica. En els miòcits cardíacs, aquests guany de funció, augmentaria la sortida espontània de Ca^{2+} del reticle durant la diàstole, produint DADs i arítmies que podrien causar la MSC.
4. El rol patogènic de la mutació G357S només es desemmascara en presència de forskolina. Aquest fet suggereix que la mutació G357S pertany a una nova classe de mutacions associades a CPVT, en les que

la patogenicitat depèn fortament de la fosforilació del canal, durant l'estimulació de la via β -adrenèrgica. Els nostres resultats amplien els mecanismes cel·lulars i moleculars pels quals les mutacions al RyR2 alteren la homeòstasi del Ca^{2+} intracel·lular i poden arribar a causar arítmies fatals als individus afectats per CPVT.

5. La introducció d'un nou lloc de fosforilació al residu S359 del RyR2, per la presència de la mutació G357S, podria explicar que la patogenicitat de la mutació només es desemmascari sota l'estimulació de la via β -adrenèrgica. Però la fosforilació d'aquest residu és poc probable, ja que es situa en una cavitat interna del canal on molècules grans com les quinases no hi poden accedir.

6. El fet que la mutació G357S només mostri la seva patogenicitat en condicions mimètiques a l'estimulació de la via β -adrenèrgica, suggereix que, per si sola, la mutació té un efecte funcional moderat. Aquest fet, pot proporcionar una explicació al fenotip variable i a la penetrància incompleta de la malaltia observada en aquesta família.

VII. Bibliografia

VII. Bibliografía

1. Priori S. Summary of Recommendations. *Europace*. 2002;4(1):3–18. doi:10.1053/eupc.2001.0214.
2. Deo R, Albert CM. Epidemiology and genetics of sudden cardiac death. *Circulation*. 2012;125(4):620–37. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.023838.
3. Campuzano O, Beltrán-Alvarez P, Iglesias A, Scornik F, Pérez G, Brugada R. Genetics and cardiac channelopathies. *Genet Med*. 2010;12(5):260–7. doi:10.1097/GIM.0b013e3181d81636.
4. Chugh SS, Reinier K, Teodorescu C, et al. Epidemiology of sudden cardiac death: clinical and research implications. *Prog Cardiovasc Dis*. 51(3):213–28. doi:10.1016/j.pcad.2008.06.003.
5. Priori SG, Aliot E, Blømstrom-Lundqvist C, et al. Task Force on Sudden Cardiac Death, European Society of Cardiology. *Europace*. 2002;4(1):3–18.
6. Amin AS, Tan HL, Wilde AAM. Cardiac ion channels in health and disease. *Heart Rhythm*. 2010;7(1):117–26. doi:10.1016/j.hrthm.2009.08.005.
7. Marbán E. Cardiac channelopathies. *Nature*. 2002;415(6868):213–8. doi:10.1038/415213a.
8. Nerbonne JM, Kass RS. Molecular Physiology of Cardiac Repolarization. 2005:1205–1253. doi:10.1152/physrev.00002.2005.
9. Donald M. Bers. *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force*. Second . Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 2001:427.
10. Bers D. Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature*. 2002.
11. Bers DM, Guo T. Calcium signaling in cardiac ventricular myocytes. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1047:86–98. doi:10.1196/annals.1341.008.
12. Martonosi AN, Pikula S. The network of calcium regulation in muscle. *Acta Biochim Pol*. 2003;50(1):1–30. doi:035001001.
13. Petersen OH. Calcium signal compartmentalization. *Biol Res*. 2002;35(2):177–82.

14. Niggli E, Shirokova N. A guide to sparkology: the taxonomy of elementary cellular Ca²⁺ signaling events. *Cell Calcium*. 2007;42(4-5):379–87. doi:10.1016/j.ceca.2007.02.010.
15. Bootman MD, Higazi DR, Coombes S, Roderick HL. Calcium signalling during excitation-contraction coupling in mammalian atrial myocytes. *J Cell Sci*. 2006;119(Pt 19):3915–25. doi:10.1242/jcs.03223.
16. Gaburjakova M, Bal NC, Gaburjakova J, Periasamy M. Functional interaction between calsequestrin and ryanodine receptor in the heart. *Cell Mol Life Sci*. 2013;70(16):2935–45. doi:10.1007/s00018-012-1199-7.
17. Brochet DXP, Yang D, Cheng H, Lederer WJ. Elementary calcium release events from the sarcoplasmic reticulum in the heart. *Adv Exp Med Biol*. 2012;740:499–509. doi:10.1007/978-94-007-2888-2_21.
18. Stern MD, Cheng H. Putting out the fire: what terminates calcium-induced calcium release in cardiac muscle? *Cell Calcium*. 2004;35(6):591–601. doi:10.1016/j.ceca.2004.01.013.
19. Lakatta EG. Functional implications of spontaneous sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release in the heart. *Cardiovasc Res*. 1992;26(3):193–214.
20. Priori SG, Chen SRW. Inherited dysfunction of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ handling and arrhythmogenesis. *Circ Res*. 2011;108(7):871–83. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.226845.
21. Liu N, Rizzi N, Boveri L, Priori SG. Ryanodine receptor and calsequestrin in arrhythmogenesis: what we have learnt from genetic diseases and transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol*. 2009;46(2):149–59. doi:10.1016/j.yjmcc.2008.10.012.
22. Katz G, Arad M, Eldar M. Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia from bedside to bench and beyond. *Curr Probl Cardiol*. 2009;34(1):9–43. doi:10.1016/j.cpcardiol.2008.09.002.
23. Priori SG, Napolitano C, Memmi M, et al. Clinical and Molecular Characterization of Patients With Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. *Circulation*. 2002;106(1):69–74. doi:10.1161/01.CIR.0000020013.73106.D8.
24. Coumel P, Fidelle J, Lucet V. Catecholaminergic-induced severe ventricular arrhythmias with Adams-Stokes syndrome in children: report of four cases. *Br Hear J*. 1978;40:28–37.:28–37.

25. Leenhardt A, Lucet V, Denjoy I, Grau F, Ngoc DD, Coumel P. Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in children. A 7-year follow-up of 21 patients. *Circulation*. 1995;91(5):1512–9.
26. Swan H, Piippo K, Viitasalo M, et al. Arrhythmic Disorder Mapped to Chromosome 1q42 – q43 Causes Malignant Polymorphic Ventricular Tachycardia in Structurally Normal Hearts. 2010.
27. Priori SG, Napolitano C, Tiso N, et al. Mutations in the Cardiac Ryanodine Receptor Gene (hRyR2) Underlie Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. *Circulation*. 2001;103(2):196–200.
28. Lahat H, Eldar M, Levy-Nissenbaum E, et al. Autosomal recessive catecholamine- or exercise-induced polymorphic ventricular tachycardia: clinical features and assignment of the disease gene to chromosome 1p13-21. *Circulation*. 2001;103(23):2822–7.
29. 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*. 2011;13(8):1077–109. doi:10.1093/europace/eur245.
30. Pflaumer A, Davis AM. Guidelines for the diagnosis and management of Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. *Heart Lung Circ*. 2012;21(2):96–100. doi:10.1016/j.hlc.2011.10.008.
31. Postma A V, Denjoy I, Kamblock J, et al. Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: RYR2 mutations, bradycardia, and follow up of the patients. *J Med Genet*. 2005;42(11):863–70. doi:10.1136/jmg.2004.028993.
32. Sumitomo N, Harada K, Nagashima M, et al. Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: electrocardiographic characteristics and optimal therapeutic strategies to prevent sudden death. *Heart*. 2003;89(1):66–70.
33. Priori SG, Wilde A a, Horie M, et al. HRS/EHRA/APHRS expert consensus statement on the diagnosis and management of patients with inherited primary arrhythmia syndromes: document endorsed by HRS, EHRA, and APHRS in May 2013 and by ACCF, AHA, PACES, and AEPC in June 2013. *Heart Rhythm*. 2013;10(12):1932–63. doi:10.1016/j.hrthm.2013.05.014.

34. Medeiros-Domingo A, Bhuiyan ZA, Tester DJ, et al. The RYR2-encoded ryanodine receptor/calcium release channel in patients diagnosed previously with either catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia or genotype negative, exercise-induced long QT syndrome: a comprehensive open reading frame muta. *J Am Coll Cardiol.* 2009;54(22):2065–74. doi:10.1016/j.jacc.2009.08.022.
35. Stenson PD, Mort M, Ball E V, Shaw K, Phillips A, Cooper DN. The Human Gene Mutation Database: building a comprehensive mutation repository for clinical and molecular genetics, diagnostic testing and personalized genomic medicine. *Hum Genet.* 2014;133(1):1–9. doi:10.1007/s00439-013-1358-4.
36. Schwartz PJ, Ackerman MJ, George AL, Wilde A a M. Impact of genetics on the clinical management of channelopathies. *J Am Coll Cardiol.* 2013;62(3):169–80. doi:10.1016/j.jacc.2013.04.044.
37. Bhuiyan ZA, Hamdan M a, Shamsi ET a, et al. A novel early onset lethal form of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia maps to chromosome 7p14-p22. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2007;18(10):1060–6. doi:10.1111/j.1540-8167.2007.00913.x.
38. Roux-Buisson N, Cacheux M, Fourest-Lieuvin A, et al. Absence of triadin, a protein of the calcium release complex, is responsible for cardiac arrhythmia with sudden death in human. *Hum Mol Genet.* 2012;21(12):2759–67. doi:10.1093/hmg/dds104.
39. Nyegaard M, Overgaard MT, Søndergaard MT, et al. Mutations in calmodulin cause ventricular tachycardia and sudden cardiac death. *Am J Hum Genet.* 2012;91(4):703–12. doi:10.1016/j.ajhg.2012.08.015.
40. Van der Werf C, Nederend I, Hofman N, et al. Familial evaluation in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: disease penetrance and expression in cardiac ryanodine receptor mutation-carrying relatives. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2012;5(4):748–56. doi:10.1161/CIRCEP.112.970517.
41. Hayashi M, Denjoy I, Extramiana F, et al. Incidence and risk factors of arrhythmic events in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation.* 2009;119(18):2426–34. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.829267.
42. Watanabe H, Chopra N, Laver D, et al. Flecainide prevents catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in mice and humans. *Nat Med.* 2009;15(4):380–3. doi:10.1038/nm.1942.

43. Postma a. V. Absence of Calsequestrin 2 Causes Severe Forms of Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. *Circ Res.* 2002;91(8):21e–26. doi:10.1161/01.RES.0000038886.18992.6B.
44. Hayashi MM, Denjoy I, Extramiana F, et al. The role of stress test for predicting genetic mutations and future cardiac events in asymptomatic relatives of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia probands. *Europace.* 2012;14(9):1344–51. doi:10.1093/europace/eus031.
45. Marian AJ. Causality in genetics: the gradient of genetic effects and back to Koch's postulates of causality. *Circ Res.* 2014;114(2):e18–21. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.302904.
46. Haugaa KH, Leren IS, Berge KE, et al. High prevalence of exercise-induced arrhythmias in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia mutation-positive family members diagnosed by cascade genetic screening. *Europace.* 2010;12(3):417–23. doi:10.1093/europace/eup448.
47. Bauce B, Rampazzo A, Basso C, et al. Screening for ryanodine receptor type 2 mutations in families with effort-induced polymorphic ventricular arrhythmias and sudden death. *J Am Coll Cardiol.* 2002;40(2):341–349. doi:10.1016/S0735-1097(02)01946-0.
48. Hofman N, Tan HL, Alders M, van Langen IM, Wilde AAM. Active cascade screening in primary inherited arrhythmia syndromes: does it lead to prophylactic treatment? *J Am Coll Cardiol.* 2010;55(23):2570–6. doi:10.1016/j.jacc.2009.12.063.
49. Franzini-Armstrong C. STUDIES OF THE TRIAD : I. Structure of the Junction in Frog Twitch Fibers. *J Cell Biol.* 1970;47(2):488–99.
50. Lai FA, Erickson HP, Rousseau E, Liu QY, Meissner G. Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle. *Nature.* 1988;331(6154):315–9. doi:10.1038/331315a0.
51. Campbell KP, Knudson CM, Imagawa T, et al. Identification and characterization of the high affinity [3H]ryanodine receptor of the junctional sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release channel. *J Biol Chem.* 1987;262(14):6460–3.
52. Johanna T. Lanner, Dimitra K. Georgiou, Aditya D. Joshi and SLH. Ryanodine Receptors: Structure, Expression, Molecular Details, and Function in Calcium Release Johanna. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(11).

53. Mueller P, Rudin DO, Tien HT, Wescott WC. Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system. *Nature*. 1962;194:979–80.
54. Tinker A, Lindsay AR, Williams AJ. A model for ionic conduction in the ryanodine receptor channel of sheep cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *J Gen Physiol*. 1992;100(3):495–517.
55. Ashley RH, Williams AJ. Divalent cation activation and inhibition of single calcium release channels from sheep cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Gen Physiol*. 1990;95(5):981–1005.
56. Yano M. Ryanodine receptor as a new therapeutic target of heart failure and lethal arrhythmia. *Circ J*. 2008;72(4):509–14.
57. Stewart R, Zissimopoulos S, Lai FA. Oligomerization of the cardiac ryanodine receptor C-terminal tail. *Biochem J*. 2003;376(Pt 3):795–9. doi:10.1042/BJ20030597.
58. Amador FJ, Stathopoulos PB, Enomoto M, Ikura M. Ryanodine receptor calcium release channels: lessons from structure-function studies. *FEBS J*. 2013;280(21):5456–70. doi:10.1111/febs.12194.
59. Kimlicka L, Van Petegem F. The structural biology of ryanodine receptors. *Sci China Life Sci*. 2011;54(8):712–24. doi:10.1007/s11427-011-4198-2.
60. Tung C, Lobo P a, Kimlicka L, Van Petegem F, Petegem F Van. The amino-terminal disease hotspot of ryanodine receptors forms a cytoplasmic vestibule. *Nature*. 2010;468(7323):585–8. doi:10.1038/nature09471.
61. Kimlicka L, Lau K, Tung C-C, Van Petegem F. Disease mutations in the ryanodine receptor N-terminal region couple to a mobile intersubunit interface. *Nat Commun*. 2013;4:1506. doi:10.1038/ncomms2501.
62. Zalk R, Clarke OB, Georges A Des, et al. Structure of a mammalian ryanodine receptor. *Nature*. 2014. doi:10.1038/nature13950.
63. Liu Y, Sun B, Xiao Z, et al. Roles of the NH2-terminal Domains of Cardiac Ryanodine Receptor in Ca²⁺ Release Activation and Termination. *J Biol Chem*. 2015:1–24. doi:10.1074/jbc.M114.618827.
64. Laver DR. Ca²⁺ stores regulate ryanodine receptor Ca²⁺ release channels via luminal and cytosolic Ca²⁺ sites. *Biophys J*. 2007;92(10):3541–55. doi:10.1529/biophysj.106.099028.

65. Györke S, Terentyev D. Modulation of ryanodine receptor by luminal calcium and accessory proteins in health and cardiac disease. *Cardiovasc Res.* 2008;77(2):245–55. doi:10.1093/cvr/cvm038.
66. Györke I, Györke S. Regulation of the cardiac ryanodine receptor channel by luminal Ca²⁺ involves luminal Ca²⁺ sensing sites. *Biophys J.* 1998;75(6):2801–10. doi:10.1016/S0006-3495(98)77723-9.
67. Xu L, Meissner G. Regulation of cardiac muscle Ca²⁺ release channel by sarcoplasmic reticulum luminal Ca²⁺. *Biophys J.* 1998;75(5):2302–12. doi:10.1016/S0006-3495(98)77674-X.
68. Ching LL, Williams AJ, Sitsapesan R. Evidence for Ca(2+) activation and inactivation sites on the luminal side of the cardiac ryanodine receptor complex. *Circ Res.* 2000;87(3):201–6.
69. Chen W, Wang R, Chen B, et al. The ryanodine receptor store-sensing gate controls Ca²⁺ waves and Ca²⁺-triggered arrhythmias. *Nat Med.* 2014;(January):1–13. doi:10.1038/nm.3440.
70. Ashutosh Tripathy LX, Pasek DA, Meissner G. Potential for Pharmacology of Ryanadine Receptor/Calcium Release Channels. *Ann N Y Acad Sci.* 853:130–48.
71. Kong H, Jones PP, Koop A, et al. Caffeine Induces Ca²⁺ Release by Reducing The Threshold for Luminal Ca²⁺ Activation of the Ryanodine Receptor Huihui. *Biochem J.* 2009;414(3):441–452. doi:10.1042/BJ20080489.Caffeine.
72. Pitt GS. Calmodulin and CaMKII as molecular switches for cardiac ion channels. *Cardiovasc Res.* 2007;73(4):641–7. doi:10.1016/j.cardiores.2006.10.019.
73. Yamaguchi N, Xu L, Pasek DA, Evans KE, Meissner G. Molecular basis of calmodulin binding to cardiac muscle Ca(2+) release channel (ryanodine receptor). *J Biol Chem.* 2003;278(26):23480–6. doi:10.1074/jbc.M301125200.
74. Xu X, Yano M, Uchinoumi H, et al. Defective calmodulin binding to the cardiac ryanodine receptor plays a key role in CPVT-associated channel dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;394(3):660–6. doi:10.1016/j.bbrc.2010.03.046.
75. Hwang HS, Nitu FR, Yang Y, et al. Divergent regulation of ryanodine receptor 2 calcium release channels by arrhythmogenic human calmodulin missense mutants. *Circ Res.* 2014;114(7):1114–24. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.303391.

76. MacMillan D. FK506 binding proteins: cellular regulators of intracellular Ca²⁺ signalling. *Eur J Pharmacol.* 2013;700(1-3):181–93. doi:10.1016/j.ejphar.2012.12.029.
77. Xiao J, Tian X, Jones PP, et al. Removal of FKBP12.6 does not alter the conductance and activation of the cardiac ryanodine receptor or the susceptibility to stress-induced ventricular arrhythmias. *J Biol Chem.* 2007;282(48):34828–38. doi:10.1074/jbc.M707423200.
78. Wehrens XHT, Lehnart SE, Huang F, et al. FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. *Cell.* 2003;113(7):829–40.
79. Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, et al. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell.* 2000;101(4):365–76.
80. Wehrens XHT, Marks AR. Altered function and regulation of cardiac ryanodine receptors in cardiac disease. *Trends Biochem Sci.* 2003;28(12):671–8. doi:10.1016/j.tibs.2003.10.003.
81. Guo T, Cornea RL, Huke S, et al. Kinetics of FKBP12.6 binding to ryanodine receptors in permeabilized cardiac myocytes and effects on Ca sparks. *Circ Res.* 2010;106(11):1743–52. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.219816.
82. Xiao B, Sutherland C, Walsh MP, Chen SRW. Protein kinase A phosphorylation at serine-2808 of the cardiac Ca²⁺-release channel (ryanodine receptor) does not dissociate 12.6-kDa FK506-binding protein (FKBP12.6). *Circ Res.* 2004;94(4):487–95. doi:10.1161/01.RES.0000115945.89741.22.
83. Van Petegem F. Ryanodine receptors: structure and function. *J Biol Chem.* 2012;287(38):31624–32. doi:10.1074/jbc.R112.349068.
84. Maier LS, Bers DM. Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation-contraction coupling in the heart. *Cardiovasc Res.* 2007;73(4):631–40. doi:10.1016/j.cardiores.2006.11.005.
85. Maier LS, Zhang T, Chen L, DeSantiago J, Brown JH, Bers DM. Transgenic CaMKII δ C overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca²⁺ handling: reduced SR Ca²⁺ load and activated SR Ca²⁺ release. *Circ Res.* 2003;92(8):904–11. doi:10.1161/01.RES.0000069685.20258.F1.
86. Valdivia HH, Kaplan JH, Ellis-Davies GC, Lederer WJ. Rapid adaptation of cardiac ryanodine receptors: modulation by Mg²⁺ and phosphorylation. *Science.* 1995;267(5206):1997–2000.

87. MacDonnell SM, García-Rivas G, Scherman JA, et al. Adrenergic regulation of cardiac contractility does not involve phosphorylation of the cardiac ryanodine receptor at serine 2808. *Circ Res.* 2008;102(8):e65–72. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.174722.
88. Shan J, Betzenhauser MJ, Reiken S, et al. Phosphorylation of the ryanodine receptor mediates the cardiac fight or flight response in mice. *J Clin Invest.* 2010;120(12):4388–98. doi:10.1172/JCI32726.
89. Ullrich ND, Valdivia HH, Niggli E. PKA phosphorylation of cardiac ryanodine receptor modulates SR luminal Ca²⁺ sensitivity. *J Mol Cell Cardiol.* 2012;53(1):33–42. doi:10.1016/j.yjmcc.2012.03.015.
90. Shan J, Betzenhauser MJ, Kushnir A, et al. Role of chronic ryanodine receptor phosphorylation in heart failure and β -adrenergic receptor blockade in mice. *J Clin Invest.* 2010;120(12):4375–87. doi:10.1172/JCI37649.
91. Xiao B, Tian X, Xie W, et al. Functional consequence of protein kinase A-dependent phosphorylation of the cardiac ryanodine receptor: sensitization of store overload-induced Ca²⁺ release. *J Biol Chem.* 2007;282(41):30256–64. doi:10.1074/jbc.M703510200.
92. Györke S, Stevens SCW, Terentyev D. Cardiac calsequestrin: quest inside the SR. *J Physiol.* 2009;587(Pt 13):3091–4. doi:10.1113/jphysiol.2009.172049.
93. Knollmann BC, Chopra N, Hlaing T, et al. Casq2 deletion causes sarcoplasmic reticulum volume increase, premature Ca²⁺ release, and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *J Clin Invest.* 2006;116(9):2510–20. doi:10.1172/JCI29128.
94. Laitinen PJ, Swan H, Kontula K. Molecular genetics of exercise-induced polymorphic ventricular tachycardia: identification of three novel cardiac ryanodine receptor mutations and two common calsequestrin 2 amino-acid polymorphisms. *Eur J Hum Genet.* 2003;11(11):888–91. doi:10.1038/sj.ejhg.5201061.
95. Jiang D, Jones PP, Davis DR, et al. Characterization of a Novel Mutation in the Cardiac Ryanodine Receptor that Results in Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. *Channels.* 2010;4(4):51–59. doi:10.4161/chan.4.4.12666.

96. Jiang D, Wang R, Xiao B, et al. Enhanced store overload-induced Ca²⁺ release and channel sensitivity to luminal Ca²⁺ activation are common defects of RyR2 mutations linked to ventricular tachycardia and sudden death. *Circ Res.* 2005;97(11):1173–81. doi:10.1161/01.RES.0000192146.85173.4b.
97. Koop A, Goldmann P, Chen SRW, Thieleczek R, Varsányi M. ARVC-related mutations in divergent region 3 alter functional properties of the cardiac ryanodine receptor. *Biophys J.* 2008;94(12):4668–77. doi:10.1529/biophysj.107.122382.
98. Liu Y, Kimlicka L, Hiess F, et al. The CPVT-associated RyR2 mutation G230C enhances store overload-induced Ca²⁺ release and destabilizes the N-terminal domains. *Biochem J.* 2013;454(1):123–31. doi:10.1042/BJ20130594.
99. Jiang D, Chen W, Wang R, Zhang L, Chen SRW. Loss of luminal Ca²⁺ activation in the cardiac ryanodine receptor is associated with ventricular fibrillation and sudden death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(46):18309–14. doi:10.1073/pnas.0706573104.
100. Zhao Y-T, Valdivia CR, Gurrola GB, Hernández JJ, Valdivia HH. Arrhythmogenic mechanisms in ryanodine receptor channelopathies. *Sci China Life Sci.* 2015;58(1):54–8. doi:10.1007/s11427-014-4778-z.
101. Tester DJ, Kopplin LJ, Will ML, Ackerman MJ. Spectrum and prevalence of cardiac ryanodine receptor (RyR2) mutations in a cohort of unrelated patients referred explicitly for long QT syndrome genetic testing. *Heart Rhythm.* 2005;2(10):1099–105. doi:10.1016/j.hrthm.2005.07.012.
102. Ikemoto N, Yamamoto T. Postulated role of inter-domain interaction within the ryanodine receptor in Ca(2+) channel regulation. *Trends Cardiovasc Med.* 2000;10(7):310–6.
103. Suetomi T, Yano M, Uchinoumi H, et al. Mutation-linked defective interdomain interactions within ryanodine receptor cause aberrant Ca²⁺ release leading to catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation.* 2011;124(6):682–94. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.023259.
104. George CH, Higgs G V, Lai FA. Ryanodine receptor mutations associated with stress-induced ventricular tachycardia mediate increased calcium release in stimulated cardiomyocytes. *Circ Res.* 2003;93(6):531–40. doi:10.1161/01.RES.0000091335.07574.86.

105. Liu N. Arrhythmogenesis in Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia: Insights From a RyR2 R4496C Knock-In Mouse Model. *Circ Res.* 2006;99(3):292–298. doi:10.1161/01.RES.0000235869.50747.e1.
106. Mohamed U, Napolitano C, Priori SG. Molecular and electrophysiological bases of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2007;18(7):791–7. doi:10.1111/j.1540-8167.2007.00766.x.
107. Zhao Y-T, Valdivia CR, Gurrola GB, et al. Arrhythmogenesis in a catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia mutation that depresses ryanodine receptor function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015. doi:10.1073/pnas.1419795112.
108. Weiss JN, Garfinkel A, Karagueuzian HS, et al. Perspective: a dynamics-based classification of ventricular arrhythmias. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;82:136–52. doi:10.1016/j.yjmcc.2015.02.017.
109. Sherry ST, Ward M, Sirotkin K. dbSNP-database for single nucleotide polymorphisms and other classes of minor genetic variation. *Genome Res.* 1999;9(8):677–9.
110. Abecasis GR, Altshuler D, Auton A, et al. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature.* 2010;467(7319):1061–73. doi:10.1038/nature09534.
111. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods.* 2010;7(4):248–9. doi:10.1038/nmeth0410-248.
112. González-Pérez A, López-Bigas N. Improving the assessment of the outcome of nonsynonymous SNVs with a consensus deleteriousness score, Condel. *Am J Hum Genet.* 2011;88(4):440–9. doi:10.1016/j.ajhg.2011.03.004.
113. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc.* 2009;4(7):1073–81. doi:10.1038/nprot.2009.86.
114. Reva B, Antipin Y, Sander C. Predicting the functional impact of protein mutations: application to cancer genomics. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(17):e118. doi:10.1093/nar/gkr407.
115. Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP. Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PLoS One.* 2012;7(10):e46688. doi:10.1371/journal.pone.0046688.

116. Geer LY, Marchler-Bauer A, Geer RC, Han L, He J, He S, Liu C, Shi W BS. The NCBI BioSystems database. *Nucleic Acids Res.* 2010.
117. Thiele H, Nürnberg P. HaploPainter: a tool for drawing pedigrees with complex haplotypes. *Bioinformatics.* 2005;21(8):1730–2. doi:10.1093/bioinformatics/bth488.
118. Heiner JD, Bullard-berent JH, Inbar S. Deadly Proposal: A case of catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. 2011;27(11):1065–1068. *Pediatr Emerg Care.*
119. Du GG, Guo X, Khanna VK, MacLennan DH. Functional characterization of mutants in the predicted pore region of the rabbit cardiac muscle Ca(2+) release channel (ryanodine receptor isoform 2). *J Biol Chem.* 2001;276(34):31760–71. doi:10.1074/jbc.M102751200.
120. Thomas NL, George CH, Lai FA. Functional heterogeneity of ryanodine receptor mutations associated with sudden cardiac death. *Cardiovasc Res.* 2004;64(1):52–60. doi:10.1016/j.cardiores.2004.06.009.
121. Díaz ME, Trafford AW, O'Neill SC, Eisner DA. Measurement of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content and sarcolemmal Ca²⁺ fluxes in isolated rat ventricular myocytes during spontaneous Ca²⁺ release. *J Physiol.* 1997;501 (Pt 1:3–16.
122. Jiang D, Xiao B, Yang D, et al. RyR2 mutations linked to ventricular tachycardia and sudden death reduce the threshold for store-overload-induced Ca²⁺ release (SOICR). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(35):13062–7. doi:10.1073/pnas.0402388101.
123. Huke S, Bers DM. Ryanodine receptor phosphorylation at Serine 2030, 2808 and 2814 in rat cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;376(1):80–5. doi:10.1016/j.bbrc.2008.08.084.
124. Wangüemert F, Bosch Calero C, Pérez C, et al. Clinical and molecular characterization of a cardiac ryanodine receptor founder mutation causing catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Heart Rhythm.* 2015. doi:10.1016/j.hrthm.2015.03.033.
125. Nof E, Cordeiro JM, Pérez GJ, et al. A common single nucleotide polymorphism can exacerbate long-QT type 2 syndrome leading to sudden infant death. *Circ Cardiovasc Genet.* 2010;3(2):199–206. doi:10.1161/CIRCGENETICS.109.898569.

126. Viswanathan PC, Benson DW, Balsler JR. A common SCN5A polymorphism modulates the biophysical effects of an SCN5A mutation. *J Clin Invest*. 2003;111(3):341–6. doi:10.1172/JCI16879.
127. George CH, Jundi H, Walters N, Thomas NL, West RR, Lai FA. Arrhythmogenic mutation-linked defects in ryanodine receptor autoregulation reveal a novel mechanism of Ca²⁺ release channel dysfunction. *Circ Res*. 2006;98(1):88–97. doi:10.1161/01.RES.0000199296.70534.7c.
128. Zhabyeyev P, Hiess F, Wang R, Liu Y, Wayne Chen SR, Oudit GY. S4153R is a gain-of-function mutation in the cardiac Ca(2+) release channel ryanodine receptor associated with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia and paroxysmal atrial fibrillation. *Can J Cardiol*. 2013;29(8):993–6. doi:10.1016/j.cjca.2012.12.019.
129. Loaiza R, Benkusky N a, Powers PP, et al. Heterogeneity of ryanodine receptor dysfunction in a mouse model of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circ Res*. 2013;112(2):298–308. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.274803.
130. Knighton DR, Zheng J, Eyck LFTEN, et al. Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science (80-)*. 1991;253(July):407–14.
131. Samsó M, Shen X, Allen PD. Structural characterization of the RyR1-FKBP12 interaction. *J Mol Biol*. 2006;356(4):917–27. doi:10.1016/j.jmb.2005.12.023.
132. Kimlicka L, Tung C-C, Carlsson A-CC, Lobo PA, Yuchi Z, Van Petegem F. The cardiac ryanodine receptor N-terminal region contains an anion binding site that is targeted by disease mutations. *Structure*. 2013;21(8):1440–9. doi:10.1016/j.str.2013.06.012.

Annex 1

Clinical and molecular characterization of a cardiac ryanodine receptor founder mutation causing catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia



Fernando Wangüemert, PhD, MD,^{*} Cristina Bosch Calero, MSc,[†] Carmelo Pérez, BD,^{*} Oscar Campuzano, PhD,^{††} Pedro Beltran-Alvarez, PhD,^{††} Fabiana S. Scornik, PhD,^{††} Anna Iglesias, MSc,^{††} Paola Berne, MD,[§] Catarina Allegue, PhD,[†] Pablo M. Ruiz Hernandez, PhD, MD,^{*} Josep Brugada, PhD, MD,[§] Guillermo J. Pérez, PhD,^{††} Ramon Brugada, PhD, MD^{†§||}

From the ^{*}Cardiavant, Centro Médico Cardiológico, Las Palmas de Gran Canaria, Spain, [†]Centre de Genètica Cardiovascular Universitat de Girona-IDIBGI, Girona, Spain, ^{††}Department of Medical Sciences, Universitat de Girona, Girona, Spain, [§]Institut Clínic del Tòrax, Universitat de Barcelona, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain, and ^{||}Hospital Universitari Josep Trueta, Girona, Spain.

BACKGROUND Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT) is a difficult-to-diagnose cause of sudden cardiac death (SCD). We identified a family of 1400 individuals with multiple cases of CPVT, including 36 SCDs during youth.

OBJECTIVES We sought to identify the genetic cause of CPVT in this family, to preventively treat and clinically characterize the mutation-positive individuals, and to functionally characterize the pathogenic mechanisms of the mutation.

METHODS Genetic testing was performed for 1404 relatives. Mutation-positive individuals were preventively treated with β -blockers and clinically characterized with a serial exercise treadmill test (ETT) and Holter monitoring. In vitro functional studies included caffeine sensitivity and store overload–induced calcium release activity of the mutant channel in HEK293 cells.

RESULTS We identified the p.G357S_RyR2 mutation, in the cardiac ryanodine receptor, in 179 family members and in 6 SCD cases. No SCD was observed among treated mutation-positive individuals over a median follow-up of 37 months; however, 3 relatives who had refused genetic testing (confirmed mutation-positive individuals) experienced SCD. Holter monitoring did not provide relevant information for CPVT diagnosis. One single ETT was unable to detect complex cardiac arrhythmias in 72% of

mutation-positive individuals, though the serial ETT improved the accuracy. Functional studies showed that the G357S mutation increased caffeine sensitivity and store overload–induced calcium release activity under conditions that mimic catecholaminergic stress.

CONCLUSION Our study supports the use of genetic testing to identify individuals at risk of SCD to undertake prophylactic interventions. We also show that the pathogenic mechanisms of p.G357S_RyR2 appear to depend on β -adrenergic stimulation.

KEYWORDS Arrhythmias; Genetic testing; CPVT; RyR2; SOICR; Sudden cardiac death

ABBREVIATIONS AS = arrhythmia score; cAMP = cyclic adenosine monophosphate; CPVT = catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia; CVA = complex ventricular arrhythmia; ECG = electrocardiogram; EC50 = half maximal effective concentration; ETT = exercise treadmill test; ICD = implantable cardioverter-defibrillator; PKA = protein kinase A; RyR2 = type 2 ryanodine receptor; SCD = sudden cardiac death; SOICR = store overload–induced calcium release; VA = ventricular arrhythmia; WT = wild type

(Heart Rhythm 2015;12:1636–1643) © 2015 Heart Rhythm Society. All rights reserved.

The first 2 authors contributed equally to this work. The last 2 authors contributed equally as senior authors. This work was supported by Fundació Obra Social “La Caixa,” Fundació Brugada (grant no. CNIC-03-2008), Fondation Leducq (European-North American Atrial Fibrillation Research Alliance (ENAFRA), grant no. 07CVD03), and Colegio Oficial de Médicos de las Palmas. Ms Bosch Calero is a predoctoral fellow at the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (PFIS-FI10/00453). Dr Campuzano, Dr Beltran-Alvarez, and Dr Allegue are Sara Borrell postdoctoral fellows at the ISCIII (CD09/00055, CD10/00275, and CD12/00592, respectively). Dr Pérez and Dr Scornik are Serra Hünter fellows. **Address reprint requests and correspondence:** Dr Guillermo J. Pérez, School of Medicine and Cardiovascular Genetics Center, Institut Investigació Biomèdica Girona, Universitat de Girona, IDIBGI C/ Pic de Peguera 11, 17003 Girona, Spain. E-mail address: guillermo.perez@udg.edu.

Introduction

Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT) is one of the most difficult sudden cardiac death (SCD)–associated diseases to manage^{1,2}; indeed, CPVT risk stratification remains unclear.³ Initially described by Coumel et al,⁴ CPVT is an inherited disease characterized by the presence of adrenergic-induced bidirectional or polymorphic ventricular tachycardia in individuals with a normal basal electrocardiogram (ECG) and structurally normal heart.

Patients with CPVT can present syncope and SCD triggered by physical or emotional stress at young ages, and SCD can be the first manifestation in up to 30% of cases.^{5–7} Symptom onset can be very early (between 7 and 9 years of age).^{1,5,8} As these patients display a normal ECG and no structural cardiac abnormalities, there is usually a delay in the diagnosis of the disease.⁵ The main tools used in the diagnosis of CPVT are exercise treadmill test (ETT) and ECG Holter monitoring.^{9,10}

Genetic links to CPVT were established in 1999 for type 2 ryanodine receptor (*RyR2*)¹¹ and in 2001 for calsequestrin (*CASQ2*).¹² However, heterogeneity in phenotypic expression of these genetic mutations was soon demonstrated, with an average disease penetrance of 54%.^{3,13} The variable phenotype resulting from a single mutation among members of an affected family suggests that additional factors might play a role in the phenotypic expression of *RyR2* mutations, which highlights the need for a mechanistic understanding of the disease.

Only 22 of the 176 mutations in *RyR2* that have been associated with CPVT have been functionally characterized in cellular models.¹⁴ However, of those, 14 mutations result in a propensity for store overload–induced calcium release (SOICR).^{15–19} SOICR is proposed to elicit calcium-activated inward currents through the activation of the sodium-calcium exchanger in the plasma membrane. This can alter the surface membrane potential and generate early and delayed afterdepolarizations, which, in turn, can lead to triggered arrhythmia (for review, see Priori and Chen²⁰).

We present here a family affected by SCD with more than 1400 living members. These individuals share a common ancestor born in 1749. Within this family, SCD has occurred at young ages during exercise and stress but in individuals with a normal basal ECG; therefore, we suspected CPVT. To determine the genetic cause of SCD in this cohort, we performed genetic analysis. After identifying a potentially causal mutation in the *RyR2* gene in 1 individual with SCD, we performed in vitro functional studies to determine the underlying mechanism in the mutant channel. In addition, we used genetic screening of 1404 living family members to identify individuals in the family at risk and begin treatment to prevent SCD. To date, this approach has averted 4 fatal outcomes. The findings of this study underscore the utility of genetic screening for ascertaining individuals at risk of SCD.

Methods

Detailed methods are provided in the [Online Supplemental Material](#).

Results

Family history

Between 1994 and 2007, 4 apparently nonrelated families from Gran Canaria Island, Spain, were investigated because of several episodes of SCD in young individuals ([Figure 1A](#)). In one of these families (family 1, [Figure 1A](#)), CPVT was suspected because 3 of the 4 daughters had experienced SCD during emotional or physical stress. After ascertaining the

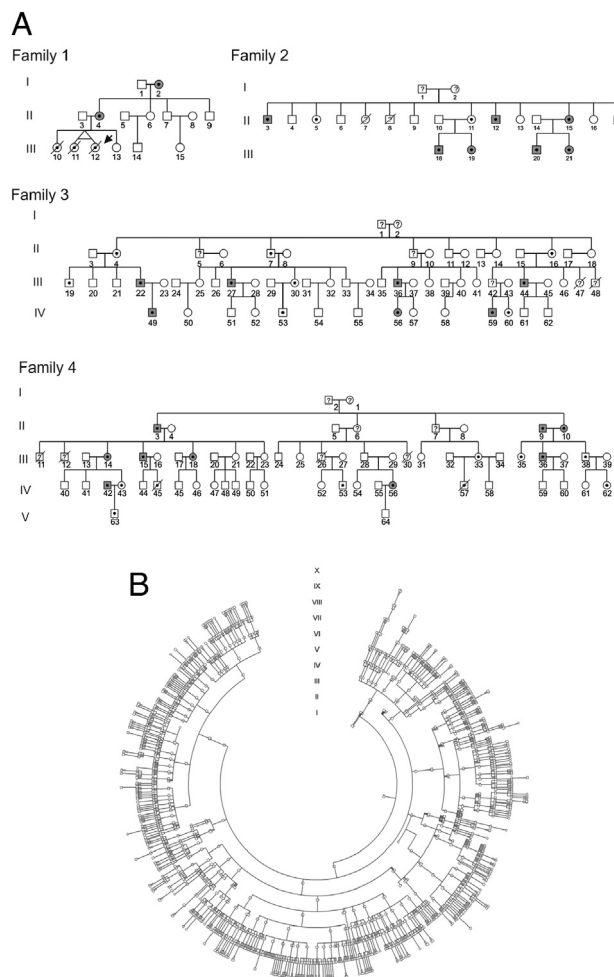


Figure 1 Family pedigrees. **A:** Pedigrees of the 4 related families from Gran Canaria. Circles represent female individuals, and squares represent male individuals. Points indicate mutation-positive individuals. Painted symbols indicate family members diagnosed with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. Labeled symbols represent family members who experienced sudden cardiac death. Interrogation mark indicates unknown genotype. The index case is indicated by an arrow. **B:** Pedigree of the large family from the Gran Canaria Islands with a common ancestor and more than 1400 living family members. It includes the 4 families from [Figure 1A](#).

4 separate families, we suspected a high degree of kinship because all individuals were inhabitants of Gran Canaria Island, a relatively isolated population. Indeed, a genealogical study of these families allowed us to identify a single large family with more than 1400 living family members and a common ancestor who was born in 1749 ([Figure 1B](#)). There were 30 more SCD cases in the family whose deaths were suggestive of CPVT.

Genetic analysis

Because mutations in *RyR2* and *CASQ* have been correlated with CPVT, the coding regions of these 2 genes were selected for an initial genetic analysis. Genetic analysis of the index case, a deceased member of family 1 ([Figure 1A](#)), revealed a *missense* mutation in exon 13 of the *RyR2* gene, in which adenine was substituted for guanine at base position 1069 of the coding sequence (Chr1: 237604682 G>A -Hg19-); this

resulted in a glycine to serine substitution at residue 357 of the RyR2 protein (p.G357S_RyR2, NP_001026.2) (Figure 2). To identify possible additional mutations in ion channels, we also analyzed 55 genes previously associated with SCD by using next-generation sequencing in the index case; only the p.G357S_RyR2 mutation was detected. The mutation was absent in 580 control alleles from the healthy population and was not found in the general population according to the locus-specific databases dbSNP, Exome Variant Server, and the 1000 Genomes. In silico analyses showed that the p.G357S_RyR2 variation was predicted to be “probably damaging” by PolyPhen-2, “deleterious” by Condel, Provean, and PhDSNP, and “pathological” by Pmut. A previous report about the p.G357S_RyR2 mutation showed that G357 residue in RyR2 was conserved among species, but its pathogenicity was unclear because no data about the cosegregation had been previously described.²¹

Familial genetic analysis in patients with documented ventricular arrhythmias (VAs) and in 6 SCD cases with available DNA revealed that all of them had the p.G357S_RyR2 mutation. A cascade screening performed in 1404 family members identified 179 living p.G357S_RyR2 mutation-positive individuals.

Functional characterization of the G357S mutation under basal conditions

To functionally characterize the effect of the G357S mutation, stable and inducible HEK293 cell lines expressing RyR2 WT (wild type) or G357S were generated. Both cell lines showed RyR2 expression after 48 hours of tetracycline induction, and no RyR2 expression was observed in the absence of tetracycline (Online Supplemental Figure 1).

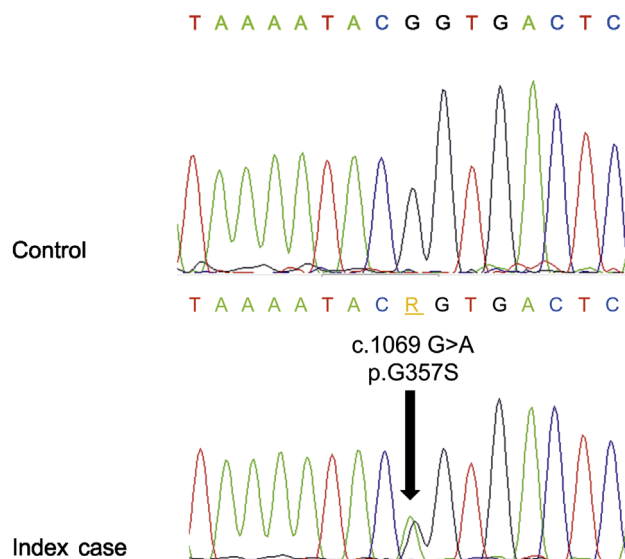


Figure 2 Electropherogram of the G357S RyR2 mutation. Sequencing analysis of genomic DNA revealed a missense mutation at position 1069 of the coding sequence of the RyR2 gene, corresponding to exon 13 (Chr1: 237604682 G>A -Hg19-). This nucleotide change results in a glycine to serine substitution in the 357th residue of the protein sequence (p. G357S_RyR2, NP_001026.2). RyR2 = type 2 ryanodine receptor.

Calcium imaging experiments were used to evaluate the activity of the RyR2 channels in terms of caffeine sensitivity and SOICR activity as a function of extracellular calcium. The evaluation of RyR2 caffeine sensitivity showed no significant differences between the half maximal effective concentrations (EC50) of RyR2 WT and RyR2 G357S variant ($EC50_{WT} = 0.16 \pm 0.08$ mM vs $EC50_{G357S} = 0.21 \pm 0.04$ mM) (Figures 3A and 3B). In addition, the SOICR analysis showed no shift between the SOICR curves and no significant differences in the EC50 for extracellular calcium ($EC50_{WT} = 0.74 \pm 0.03$ mM vs $EC50_{G357S} = 0.71 \pm 0.03$ mM) (Figures 3C and 3D).

Functional characterization of the G357S mutation under conditions that mimic catecholaminergic stress

Increased sympathetic activity is a typical physiological response to stress and is thought to be the basis of arrhythmias in CPVT. Activation of the adrenergic signaling pathway generates increased cyclic adenosine monophosphate (cAMP) levels and activates protein kinase A (PKA). In the heart, activated PKA can phosphorylate RYR2 at 2 residues, S2030 and S2808. The phosphorylation of these serine residues increases the resting open probability of RyR2 promoting a calcium leak from the sarcoplasmic reticulum.^{22,23} To evaluate the activity of the RyR2 channel under conditions that mimic catecholaminergic stress, calcium-imaging experiments were performed using forskolin to increase intracellular levels of cAMP. Caffeine sensitivity of the G357S channel was higher than that of the WT channel in the presence of forskolin (Figures 4A and 4B). We observed a significant shift to the left for the G357S caffeine curve, which produced significant differences between the EC50 under conditions that mimic catecholaminergic stress ($EC50_{WT} = 0.095 \pm 0.01$ mM and $EC50_{G357S} = 0.069 \pm 0.01$ mM; $n = 7$; $P < .0001$) (Figure 4B). Furthermore, in the presence of forskolin, SOICR activity was significantly higher in cells expressing RyR2 G357S than in cells expressing RyR2 WT; for example, at 500 μ M calcium the oscillation per minute was 1.21 ± 0.04 for WT cells and 1.55 ± 0.05 for G357S cells ($n_{WT} = 234$ and $n_{G357S} = 298$; $P < .0001$) (Figures 4C and 4D). In addition, forskolin modulated spontaneous release activity in a concentration-dependent fashion (Figure 4E), and RyR2 G357S cells had a greater response to increasing concentrations of forskolin. At 5 μ M forskolin, the number of oscillations was 1.25 ± 0.02 for WT cells and 1.43 ± 0.02 for G357S cells ($n = 6$; $P < .001$).

Analysis of RyR2 phosphorylation

Because of the differential response of cells harboring WT or mutant RyR2 channels to elevated cAMP levels, we hypothesized that the introduction of S357 may create a new PKA phosphorylation site, which could be phosphorylated in the presence of forskolin. We first immunopurified G357S RyR2 from forskolin-treated cells and subjected it to

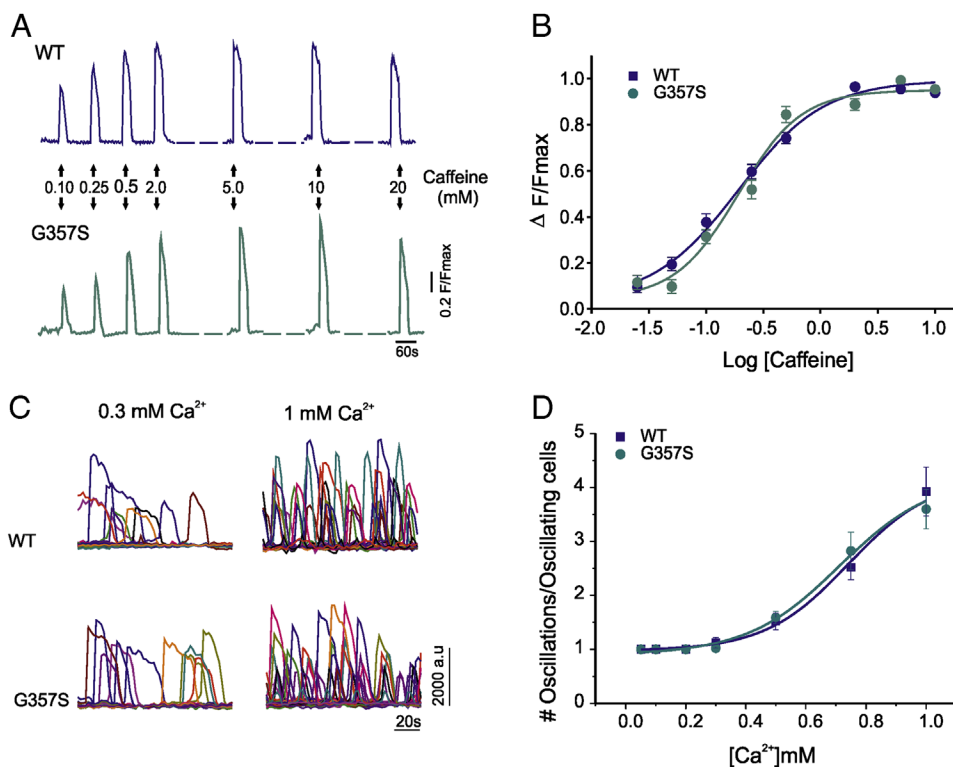


Figure 3 Functional characterization of the RyR2 WT and mutant channel under basal conditions. **A:** Representative fluorescence over time traces, from multiple cells, showing caffeine-induced transients. **B:** Normalized amplitudes of Ca^{2+} transients are plotted as a function of caffeine concentration. No differences were found in sensitivity to caffeine between WT RyR2- and G357S RyR2-expressing cells. **C:** Representative fluorescence over time traces, from 30 cells, showing SOICR activity of WT and G357S cells in 0.3 mM Ca^{2+} and in 1 mM Ca^{2+} ; each color represents 1 cell. **D:** Oscillations per oscillating cells as a function of increasing extracellular Ca^{2+} . No differences were found in SOICR activity between cells expressing RyR2 WT and the G357S variant. RyR2 = type 2 ryanodine receptor; SOICR = store overload-induced calcium release; WT = wild type.

proteomic analysis. Although protein coverage was relatively high ($\sim 40\%$) for such a large membrane protein (Online Supplemental Figure 2), the peptide containing S357 (tryptic peptide spanning residues Y355 to K380) was not detected by our mass spectrometric analysis. In an attempt to increase sequence coverage, we digested the same sample with chymotrypsin, but no peptide containing S357 was observed after mass spectrometric analysis.

We then decided to perform PKA phosphorylation assays in vitro, using synthetic peptides containing either G357 (WT) or S357 (mutant). However, we did not observe phosphorylation of S357 (not shown).

Baseline characteristics of SCD members and living mutation-positive individuals

Thirty-six SCDs had occurred in the family and at a young age (< 42 years old; Table 1); most were in the last 20 years. Of all SCD events, 69.4% occurred in men, and 77.4% of deaths were associated with exercise or emotional stress. In the SCD group, the presence of previous symptoms, especially syncope (73% of cases), was common. In 22% of SCD cases with reliable data, SCD was the first manifestation of the disease. In the group of living mutation-positive individuals, 25.9% had presented symptoms before p.G357S_RyR2 was detected (Table 1 and Online Supplemental Table 3). The basal mean heart rate, without treatment, measured by

24-hour Holter monitoring was significantly lower ($P = .011$) in mutation-positive individuals (71.0 ± 10.6 beats/min; $n = 139$) than in control individuals (76.3 ± 10.2 beats/min; $n = 32$). Sinus bradycardia, measured by a basal ECG, occurred in 18.2% of mutation-positive individuals and in 3.1% of controls ($P = .009$), adjusted by age in children younger than 16 years.²⁴ Given the lethality of CPVT and the high frequency of SCD in the family, we decided to preventively treat all mutation-positive individuals with β -blockers. One patient was also treated with flecainide because of paroxysmal atrial fibrillation and another was treated with calcium channel blockers because of high blood pressure. No sympathectomy was performed.

Clinical investigation in mutation-positive individuals

Basal ETTs were performed in 150 mutation-positive individuals under no pharmacological treatment as soon as genetic diagnosis was confirmed. Disease penetrance and expression in these individuals were heterogeneous. During the basal ETT, 28% of mutation-positive individuals exhibited complex ventricular arrhythmia (CVA) (1.4% in controls); the proportion grew to 46.3% (10% in controls) if VA was considered. The accuracy of the basal ETT to diagnose mutation-positive individuals was 0.504 for CVA and 0.586 for VA (Table 2). Mutation-positive individuals treated with

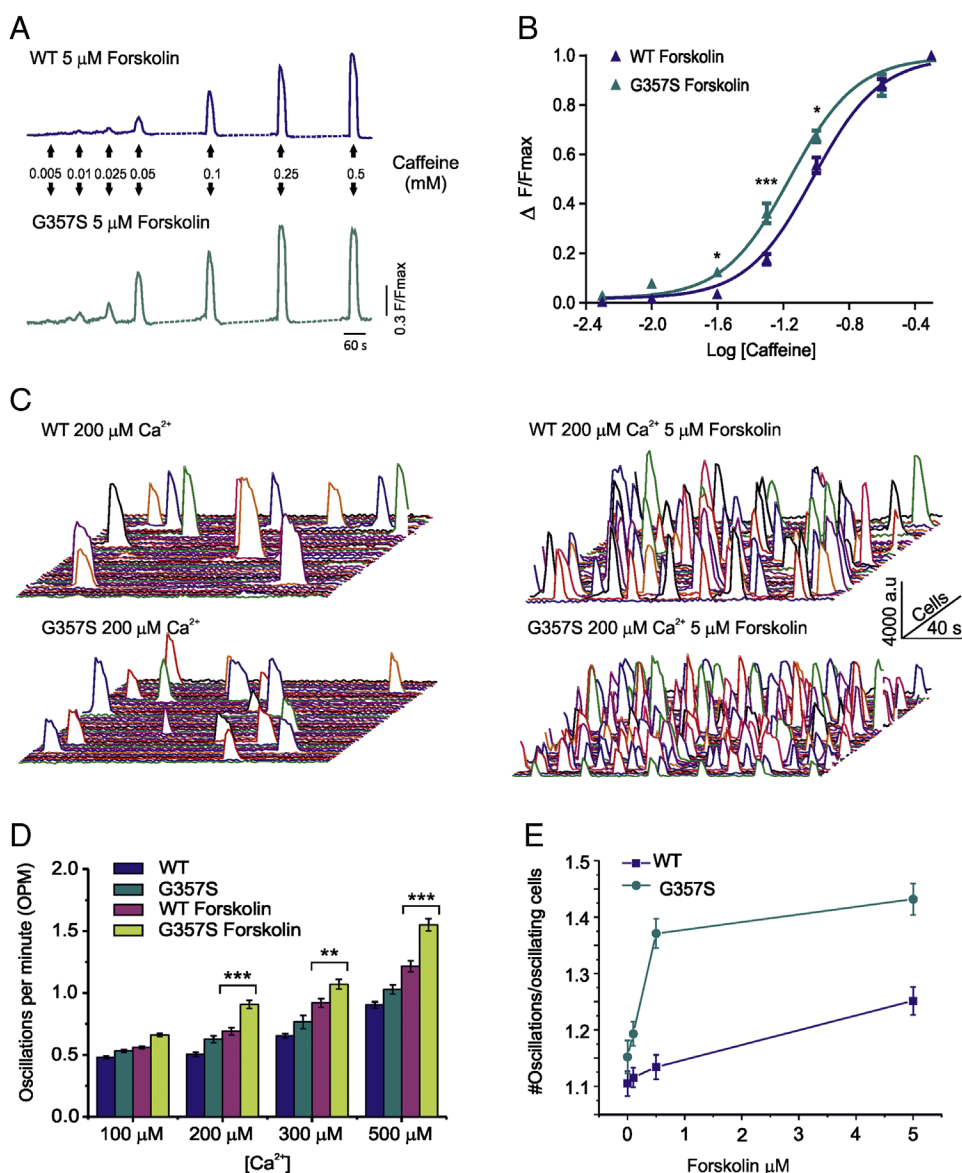


Figure 4 Functional characterization of the RyR2 WT and mutant channel under conditions that mimic catecholaminergic stress. **A:** Representative fluorescence over time traces, from multiple cells, showing caffeine-induced transients in the presence of forskolin. **B:** Normalized amplitudes of Ca^{2+} transients are plotted as a function of caffeine concentration with forskolin. The G357S RyR2-expressing cells show higher caffeine sensitivity in the presence of forskolin than do WT RyR2-expressing cells. **C:** Representative traces of SOICR activity of cells expressing RyR2 WT or G357S in $200 \mu M Ca^{2+}$. Each trace represents individual cell fluorescence (54 cells imaged). Left panels show the frequency of oscillations in $200 \mu M Ca^{2+}$ for both cell types. Right panels show the increase in frequency and in number of oscillations with the forskolin treatment, with a greater change in activity in RyR2 G357S cells. **D:** Oscillations per minute as a function of Ca^{2+} , with or without $5 \mu M$ forskolin. SOICR activity is higher in cells expressing RyR2 G357S protein in the presence of forskolin. **E:** Number of oscillations per oscillating cells as a function of forskolin concentration. The G357S mutant channel-expressing cells show a higher SOICR activity in the presence of forskolin than do WT RyR2 cells. RyR2 = type 2 ryanodine receptor; SOICR = store overload-induced calcium release; WT = wild type.

β -blockers (n = 138) were clinically investigated with a serial ETT (Table 3). With a mean of 6.5 ETTs per patient (median 7 ETTs per patient), 1121 ETTs were performed: 149 without treatment, 549 on bisoprolol (mean maximum dose 7.5 ± 5 mg), 242 on propranolol (mean maximum dose 110.6 ± 65 mg), 47 on metoprolol, 38 on atenolol, and 51 on other β -blockers. Bisoprolol was preferentially used because it is taken once daily, and although it seems that nanodol provides superiority of protection in CPVT,² it was not used in our protocol because it is scarcely available in Spain. We analyzed the 2 most used β -blockers in our study in a series

of 43 patients who received both treatments at different times. This series shows that the mean quantitative arrhythmia score (AS) was 64.73 for bisoprolol and 29.43 for propranolol considering ventricular ectopic beats (AS-1) ($P < .001$) and 52.40 and 12.28, respectively, considering CVA (AS-2) ($P < .001$).

A serial ETT proved to be effective in uncovering at least 1 VA-positive test in mutation-positive individuals despite β -blocker treatment. After 10 ETTs, 74% of p.G357S_RyR2-positive individuals showed CVA, and if VA was considered, this proportion reached 91% (Table 3). A

Table 1 Baseline characteristics of the studied individuals

Characteristic	SCD (n = 36)	Mutation-positive (n = 179)	P (SCD/ mutation-positive)
Age of death (y)	18.1 ± 8.8*	—	—
Age at genetic diagnosis (y)	—	38.5 ± 20.8	
Sex: male	25 (69.4)	80 (44.1)	.006 [†]
Symptoms	27 (75)	46 (25.9)	< .001 [§]
Dizziness	5 (14.3)	18 (10.0)	.642 [†]
Syncope	26 (73.7)	10 (17.9)	< .001 [†]
Syncope, age at onset of syncope (y)	14.1 ± 6.5	24.7 ± 17.5	.286

Values are presented as absolute number and corresponding percentage in parenthesis, or mean ± SD.

SCD = sudden cardiac death.

*Range 5–42 y.

[†]Fisher exact test.

[§] χ^2 test.

^{||}Mann-Whitey test.

total of 750 Holter monitorings were performed during the follow-up (mean 4.3 Holter monitorings per mutation-positive subject); its accuracy (0.360) to diagnose CPVT in mutation-positive individuals was inferior to the ETT accuracy (Table 2).

Clinical events at follow-up

Implantable cardioverter-defibrillators (ICDs) were implanted in 40 mutation-positive individuals (22%); 6 of them (15%) were implanted before the beginning of the protocol. The reasons for implantation were presyncope (n = 4 [10%]), syncope (n = 20 [50%]), and CVA (n = 16 [40%]) despite β -blocker treatment. After more than 5 years of ICD implantation, 5 ICD events have been recorded in 4 patients: 2 nonsustained ventricular tachycardia (287 and 250 beats/min) and 3 ICD discharges (Ventricular tachycardia or ventricular fibrillation, 303 ± 21 beats/min). Patients who received discharges were not taking β -blockers for personal reasons. We recorded only 1 inappropriate discharge (inappropriate shock rate 0.32 per year). The cumulative incidence of symptoms (dizziness or syncope) in mutation-positive individuals in our protocol was 11%, and no SCD has been reported in this group since our intervention (Figure 5). Another 53 family members were potential mutation-positive individuals, but they refused genetic testing and clinical evaluation. These individuals were asymptomatic but considered at risk because they were either first-degree relatives of SCD cases or of G357S-positive individuals. During the follow-up, 3 SCDs (1 aborted) occurred in this group of patients. These 3 SCDs occurred in a 16-year-old boy who died suddenly while playing in a music hall, a 31-year-old man who died while exercising, and a 38-year-old woman who experienced an aborted SCD. All of them were subsequently identified as p.G357S_RyR2-positive individuals.

Discussion

We report the association of the p.G357S_RyR2 variation with CPVT. Our experimental evidence supports the pathogenic role of this founder mutation and a plausible

mechanism that helps explain the phenotype. We actively performed cascade screening, involving genealogical studies, to identify individuals at risk. We present the clinical workup of 179 mutation-positive individuals, all members of a large family from the Canary Islands. This identical mutation series constitutes the largest CPVT series studied so far. The reliability of the screening of CPVT using the currently recommended clinical diagnostic approach is controversial and seems to have low sensitivity, especially with a single test.

Functional characterization of the G357S RyR2 channel

The majority of functional studies of RyR2 mutations associated with CPVT performed to date show an enhanced propensity for SOICR activity in cells expressing mutant channels^{15–19} and higher sensitivity to caffeine.²⁵ This is not the case for p.G357S_RyR2, which, under basal conditions, produce neither an increase in the SOICR activity nor an increase in the sensitivity to caffeine of the channel. However, SOICR of G357S cells and their sensitivity to caffeine was much greater under conditions that mimic β -adrenergic stimulations. Loaiza et al²⁶ showed that the SOICR activity of RyR2 was not modified by the V2475F RyR2 mutation; however, β -adrenergic stimulated ventricular myocytes from V2475F+/- mice showed an increased propensity for spontaneous calcium release events, which is reminiscent of our observations. In the present study, in vitro experiments

Table 2 Evaluation of the basal ETT and Holter monitoring

Basal test parameter	VA-ETT (n = 220)	CVA-ETT (n = 220)	VA-Holter (n = 166)
Sensitivity (%)	46.0	28.0	21.6
Specificity (%)	85.7	98.6	84.4
PPV (%)	87.3	97.7	85.3
NPV (%)	42.5	39.0	20.5
Accuracy	0.586	0.504	0.360

CVA = complex ventricular arrhythmia; ETT = exercise treadmill test; NPV = negative predictive value; PPV = positive predictive value; VA = ventricular arrhythmia.

Table 3 Mutation-positive individuals with arrhythmias in consecutive ETTs

Consecutive ETT interval	Ventricular arrhythmias			Complex ventricular arrhythmias	
	N	n	%	N	%
ETT1	150	69	46.0	42	28.0
ETT1-ETT2	141	78	55.3	53	37.5
ETT1-ETT3	132	91	67.9	59	44.6
ETT1-ETT4	131	96	72.7	63	48.1
ETT1-ETT5	130	99	76.2	68	52.3
ETT1-ETT6	127	101	79.5	70	55.1
ETT1-ETT7	120	101	84.2	73	60.8
ETT1-ETT8	116	102	87.9	79	68.1
ETT1-ETT9	114	103	90.4	82	71.9
ETT1-ETT10	114	104	91.2	85	74.5

ETT = exercise treadmill test; N = patients available for analysis; n = mutation-positive individuals with arrhythmias in the ETT.

indicate that the mutated site, S357, itself is unlikely to be a target for PKA phosphorylation. Moreover, the recently published structure of RyR1²⁷ strongly suggests that large molecules such as kinases would be sterically hindered to access the serine at position 357. Taken together, our findings suggest that p.G357S_RyR2 pathogenicity might depend on β -adrenergic stimulation, which may underlie the variable phenotypic expression and incomplete penetrance of the disease in this family. Nevertheless, the description of the precise mechanism(s) that underlies pathogenicity of RyR2 G357S exceeds the scope of the present study.

Clinical evaluation

Although the ETT and Holter monitoring are currently recommended methods for CPVT diagnosis,⁹ our clinical investigation, based on these methods, would not have

diagnosed a significant proportion of mutation-positive individuals in this family. Holter monitoring for 24 hours did not provide relevant information for the diagnosis of CPVT. Notably, the performance of only 1 ETT misdiagnosed 54% of mutation-positive individuals (72% if CVA is used as the threshold). Our serial ETT protocol notably improved sensitivity, and we strongly recommend the performance of several ETTs if CPVT is suspected in individuals with unavailable genetic testing. The protocol we used, based on 3 months of serial ETT and β -blocker titration to achieve $\leq 80\%$ theoretical maximum heart rate and no VA, was effective. Our results also suggest that propranolol was more effective than bisoprolol to prevent quantity and severity of VAs in the stress test. No fatal events occurred in patients under our protocol. However, 3 SCDs (1 aborted) occurred in the group of family members that refused genetic testing and were not treated. These results reinforce the current clinical guidelines, which suggest that mutation-positive family members could receive β -blockers even if they do not manifest signs of the disease during clinical evaluations.⁹

Conclusion

The present study provides important mechanistic insight to establish likely disease-causative links for this mutation. Our findings suggest that cAMP elevation unmasks a concealed pathogenic behavior of the G357S RyR2 channel. Our study also supports recent claims that advocate for the use of genetic testing to identify individuals at risk of SCD to undertake prophylactic interventions.²⁸ We demonstrated that β -blockers and a serial ETT-based protocol were useful and effective in the management of CPVT and should be recommended to all CPVT mutation-positive individuals in the absence of reliable risk-stratification tools.

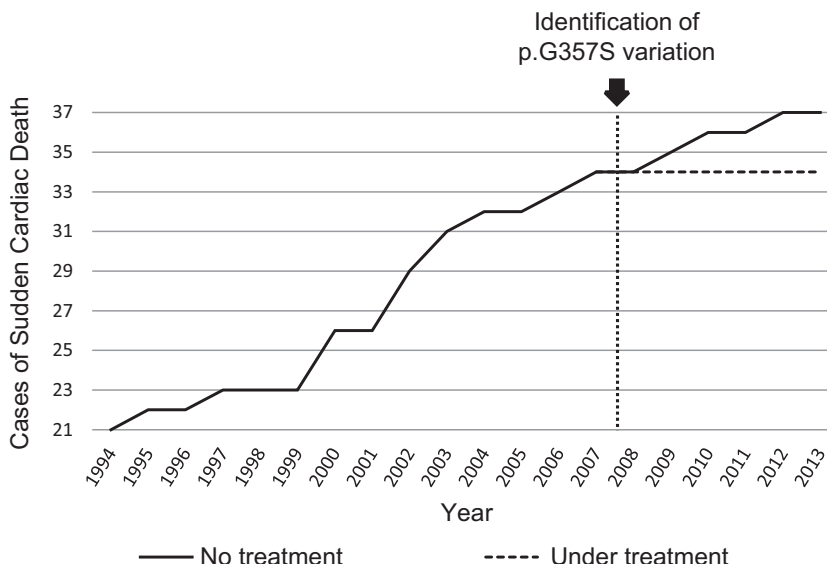


Figure 5 Prevalence of sudden cardiac death during follow-up. Incidence of sudden cardiac death or cardiac arrest between 1994 and 2013 before and after the identification of the p.G357S variation in RyR2 in this large family from Gran Canaria. RyR2 = type 2 ryanodine receptor.

Acknowledgments

We thank Dr Yijun Tang and Dr Wayne Chen at the University of Calgary, Cristina Chiva and Eduard Sabidó at Proteomics Unit (CRG/UPF), and Eliandre de Oliveira and Antonia Odena at Proteomics Platform (UB). We also acknowledge Eduardo Caballero, Julio Hernández, Olga Medina, Anibal Rodríguez, Estanislao Soriano, Pedro Suarez, Victor Naranjo, and Francisco Hernández, members of “Programa de Diagnóstico Precoz de Cardiopatía Familiar con alto riesgo de Muerte Súbita.”

Appendix

Supplementary data

Supplementary material cited in this article is available online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.hrthm.2015.03.033>.

References

- Leenhardt A, Lucet V, Denjoy I, Grau F, Ngoc DD, Coumel P. Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in children: a 7-year follow-up of 21 patients. *Circulation* 1995;91:1512–1519.
- Hayashi M, Denjoy I, Extramiana F, et al. Incidence and risk factors of arrhythmic events in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation* 2009;119:2426–2434.
- Van der Werf C, Nederend I, Hofman N, et al. Familial evaluation in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: disease penetrance and expression in cardiac ryanodine receptor mutation-carrying relatives. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2012;5:748–756.
- Coumel P, Fidelle J, Lucet V. Catecholaminergic-induced severe ventricular arrhythmias with Adams-Stokes syndrome in children: report of four cases. *Br Heart J* 1978;40:28–37.
- Postma AV, Denjoy I, Kamblock J, Alders M, Lupoglazoff J-M, Vaksman G, Dubosq-Bidot L, Sebillon P, Mannens MMAM, Guicheney P, Wilde AAM. Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: RYR2 mutations, bradycardia, and follow up of the patients. *J Med Genet* 2005;42:863–870.
- Priori SG, Napolitano C, Memmi M, et al. Clinical and molecular characterization of patients with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation* 2002;106:69–74.
- Sumitomo N, Harada K, Nagashima M, et al. Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: electrocardiographic characteristics and optimal therapeutic strategies to prevent sudden death. *Heart* 2003;89:66–70.
- Priori SG, Napolitano C, Tiso N, Memmi M, Vignati G, Bloise R, Sorrentino V, Danieli GA. Mutations in the cardiac ryanodine receptor gene (hRyR2) underlie catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation* 2001;103:196–200.
- Priori SG, Wilde AA, Horie M, et al. HRS/EHRA/APHR expert consensus statement on the diagnosis and management of patients with inherited primary arrhythmia syndromes: document endorsed by HRS, EHRA, and APhRS in May 2013 and by ACCF, AHA, PACES, and AEPC in June 2013. *Heart Rhythm* 2013;10:1932–1963.
- Haugaa KH, Leren IS, Berge KE, Bathen J, Loennechen JP, Anfinsen O-G, Früh A, Edvardsen T, Kongsgård E, Leren TP, Amlie JP. High prevalence of exercise-induced arrhythmias in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia mutation-positive family members diagnosed by cascade genetic screening. *Europace* 2010;12:417–423.
- Swan H, Piippo K, Viitasalo M, Heikkilä P, Paavonen T, Kainulainen K, Kere J, Keto P, Kontula K, Toivonen L. Arrhythmic disorder mapped to chromosome 1q42-q43 causes malignant polymorphic ventricular tachycardia in structurally normal hearts. *J Am Coll Cardiol* 1999;34:2035–2042.
- Lahat H, Pras E, Olender T, et al. A missense mutation in a highly conserved region of CASQ2 is associated with autosomal recessive catecholamine-induced polymorphic ventricular tachycardia in Bedouin families from Israel. *Am J Hum Genet* 2001;69:1378–1384.
- Bauce B, Rampazzo A, Basso C, Bagattin A, Daliento L, Tiso N, Turrini P, Thiene G, Danieli GA, Nava A. Screening for ryanodine receptor type 2 mutations in families with effort-induced polymorphic ventricular arrhythmias and sudden death. *J Am Coll Cardiol* 2002;40:341–349.
- Stenson PD, Mort M, Ball EV, Shaw K, Phillips A, Cooper DN. The Human Gene Mutation Database: building a comprehensive mutation repository for clinical and molecular genetics, diagnostic testing and personalized genomic medicine. *Hum Genet* 2014;133:1–9.
- Jiang D, Jones PP, Davis DR, Gow R, Green MS, Birnie DH, Chen SRRW, Gollob MH. Characterization of a novel mutation in the cardiac ryanodine receptor that results in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Channels* 2010;4:51–59.
- Jiang D, Wang R, Xiao B, Kong H, Hunt DJ, Choi P, Zhang L, Chen SRW. Enhanced store overload-induced Ca²⁺ release and channel sensitivity to luminal Ca²⁺ activation are common defects of RyR2 mutations linked to ventricular tachycardia and sudden death. *Circ Res* 2005;97:1173–1181.
- Liu Y, Kimlicka L, Hiess F, Tian X, Wang R, Zhang L, Jones PP, Van Petegem F, Chen SRW. The CPVT-associated RyR2 mutation G230C enhances store overload-induced Ca²⁺ release and destabilizes the N-terminal domains. *Biochem J* 2013;454:123–131.
- Zhabyevev P, Hiess F, Wang R, Liu Y, Wayne Chen SR, Oudit GY. S4153R is a gain-of-function mutation in the cardiac Ca(2+) release channel ryanodine receptor associated with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia and paroxysmal atrial fibrillation. *Can J Cardiol* 2013;29:993–996.
- Jiang D, Xiao B, Yang D, Wang R, Choi P, Zhang L, Cheng H, Chen SRW. RyR2 mutations linked to ventricular tachycardia and sudden death reduce the threshold for store-overload-induced Ca²⁺ release (SOICR). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:13062–13067.
- Priori SG, Chen SRW. Inherited dysfunction of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ handling and arrhythmogenesis. *Circ Res* 2011;108:871–883.
- Medeiros-Domingo A, Bhuiyan ZA, Tester DJ, Hofman N, Bikker H, van Tintelen JP, Mannens MMAM, Wilde AAM, Ackerman MJ. The RYR2-encoded ryanodine receptor/calcium release channel in patients diagnosed previously with either catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia or genotype negative, exercise-induced long QT syndrome: a comprehensive open reading frame mutational analysis. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:2065–2074.
- Huke S, Bers DM. Ryanodine receptor phosphorylation at serine 2030, 2808 and 2814 in rat cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;376:80–85.
- Niggli E, Ullrich ND, Gutierrez D, Kyrychenko S, Poláková E, Shirokova N. Posttranslational modifications of cardiac ryanodine receptors: Ca(2+) signaling and EC-coupling. *Biochim Biophys Acta* 2013;1833:866–875.
- Rijnbeek PR, Witsenburg M, Schrama E, Hess J, Kors JA. New normal limits for the paediatric electrocardiogram. *Eur Heart J* 2001;22:702–711.
- Kong H, Jones PP, Koop A, Zhang L, Duff HJ, Wayne SR. Caffeine induces Ca²⁺ release by reducing the threshold for luminal Ca²⁺ activation of the ryanodine receptor. *Biochem J* 2008;414:441–452.
- Loaiza R, Benkusky N, Powers PP, Hacker T, Noujaim S, Ackerman MJ, Jalife J, Valdivia HH. Heterogeneity of ryanodine receptor dysfunction in a mouse model of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circ Res* 2013;112:298–308.
- Efremov RG, Leitner A, Aebersold R, Raunser S. Architecture and conformational switch mechanism of the ryanodine receptor. *Nature* 2015; 517:39–43.
- Hofman N, Tan HL, Alders M, van Langen IM, Wilde AAM. Active cascade screening in primary inherited arrhythmia syndromes: does it lead to prophylactic treatment? *J Am Coll Cardiol* 2010;55:2570–2576.

CLINICAL PERSPECTIVES

Our study provides evidence that genetic testing can become the first screening tool for the primary prevention of sudden cardiac death in large families, especially in those diseases in which there are effective, noninvasive therapies available. We demonstrate the efficacy of a protocol based on β -blockers and a serial ETT in the management of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. We recommend this close follow-up (every 3 months) to all catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia mutation-positive individuals. Additional research is needed to determine whether p. G357S_RyR2-positive individuals experience a varied degree of arrhythmogenic events depending on the level of sympathetic activation. This may provide a rationale for the incomplete penetrance of the disease in this family.